

# **Környezeti feltételváltozások és biológiai rendszer válaszok**

*Ph.D. értekezés*

*Molnár Zsolt*

*Szerző*

**Dr. habil Gálfi Márta Ph.D.**  
*habilitált főiskolai tanár*  
*témavezető*

**Dr. Valkusz Zsuzsanna Ph.D.**  
*klinikai főorvos*  
*témavezető*

**Környezettudományi Doktori Iskola**

**SZTE TTIK**

**Környezet-biológia és Környezeti Nevelés Tanszék**

**Szeged**

**2015**

# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	4
<b>1. Bevezetés .....</b>	<b>6</b>
<b>2. Kémiai környezetterhelések és az endokrin rendszer .....</b>	<b>8</b>
2.1 Homeosztatikus diszruptor vegyületek .....	8
2.2 HD vegyületek és az ionhomeosztázis .....	10
2.3 A hipotalamo-adenohipofizeális komplexitás .....	11
2.4 Prolaktin szekréció szabályozása .....	14
2.5 Prolaktin és szignál-transzdukció .....	17
2.6 Laktotrop adenoma .....	18
2.7 ACTH szekréció szabályozása .....	21
2.8 Homeosztatikus anyag-energiaháztartás hálózatok .....	22
2.9 A sejtek ion homeosztázisa .....	23
2.10 Hipokalémia és az apoptózis .....	25
<b>3. Célkitűzés .....</b>	<b>27</b>
<b>4. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>29</b>
4.1 Kísérleti állatok .....	29
4.2 Indukált prolaktinóma és <i>in vitro</i> kísérletek .....	29
4.2.1 Apoptózis vizsgálata (immunocitokémia) .....	31
4.2.2 Statisztikai analízis .....	31
4.3 Homeosztatikus diszruptor vegyületek tanulmányozására felállított kísérleti protokoll .....	32
4.3.1 <i>In vivo</i> vizsgálati protokoll .....	32
4.3.2 <i>In vitro</i> experimentális protokoll .....	32
4.3.3 Adenohipofízis immunhisztokémia .....	33
4.3.4 Statisztikai analízis .....	33
<b>5. Eredmények .....</b>	<b>35</b>
5.1 Hipokalémia hatásainak detektálása normál és megváltozott endokrin funkciók esetében .....	35
5.1.1 Az indukált prolaktinóma és a normál adenohipofízis sejt kultúrák ACTH elválasztása hipokalémia hatására .....	35
5.1.2 A különböző $[K^+]$ kezelések hatása a PRL release kinetikájára normál és prolaktinómás adenohipofízis esetében .....	39
5.1.3 Normál adenohipofízis és 0 mM $[K^+]$ -val kezelt prolaktinómás adenohipofízis ACTH és PRL szekréciója .....	43
5.1.4 Immunofestés .....	45
5.2 Kombinált klórbenzol expozíciók hatásainak vizsgálati eredményei .....	46
5.2.1 Szérum ACTH hormon értékek .....	46

5.2.2 Adenohipofízis sejtkultúrák hormon szekréciója .....	47
5.2.3 $Mg^{2+}$ -dependens ATPáz aktivitásának változása .....	48
5.2.4 Adenohipofízis immunhisztokémiai vizsgálatok .....	49
<b>6. Megbeszélés, következtetések .....</b>	<b>51</b>
<b>7. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>59</b>
<b>8. Felhasznált irodalom.....</b>	<b>60</b>
<b>9. Összefoglalás .....</b>	<b>76</b>
<b>10. Summary .....</b>	<b>81</b>

### ***Rövidítések jegyzéke***

ACTH: adrenokortikotrop hormon

AdH: adenohipofízis

AP1: aktivátor-protein 1

ASK1: apoptózis-szignál-reguláló kináz

AVP: arginin vazopresszin

Bcl-2: B-sejt limfóma 2 protein

BPA: biszfenol-A

CAdh<sub>ACTH</sub>: kontroll AdH ACTH elválasztása

CPRLoma<sub>ACTH</sub>: kontroll PRLma ACTH elválasztása

CAdh<sub>PRL</sub>: kontroll AdH PRL elválasztása

CPRLoma<sub>PRL</sub>: kontroll PRLma PRL elválasztása

cAMP: ciklikus 3'-5'-adenozin-monofoszfát

CIS: citokin indukált SH2-tartalmú protein

CIB: hexaklórbenzol és 1,2,4-triklórbenzol mix

CRH: kortikotropin-releasing hormon

C-JUN: C-JUN N-terminális kináz

DAB: 3,3'-diaminobenzidin tetra-hidroklorid

DA: dopamin

DDT: diklóro-difenil triklóro-etán

EDC: endokrin diszruptor vegyületek

FGF2: fibroblast-növekedési-faktor-2

Fyn: tirozin protein kináz

GABA:  $\gamma$ -amino vajsav

GH: növekedési hormon

GTP: guanozin-trifoszfát

HCB: hexaklórbenzol

HD: homeosztatisz diszruptor vegyületek

HPA: axis hipofízis-mellékvese cortex tengely

LIA: immuno-chemiluminescence assay

JAK2: Janus-arcú kináz

LHA: laterális hipotalamikus terület

MAPK: mitogén aktivált szerint/treonin protein kináz

NADPH: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NH: neurohipofízis

NP: nucleus paraventricularis

NS: nucleus supraopticus

OP: oktilfenol

OT: oxitocin

PHDA: periventricularis-hipotalamikus-DAerg neuronok

PI3K: foszfatidil-inozitol-3 kináz

PIF: prolaktin gátló faktorok

PRF: prolaktin serkentő faktorok

PLC: foszfolipáz-C

PRL: prolaktin

PRLoma: prolaktinóma

PRL-R: prolaktin receptor

p38: mitogén aktivált protein kináz

RIA: radioimmunoassay

Shc, Grb2, Sos: adapter fehérjék

SNARE: szolubilis NSF és SNAP receptor fehérje

SOCS: citokin-szignál szupresszorok

Stat: szignál transzducer és transzkripció aktivátor protein

TBS: trisz(hidroximetil)-aminometán

TCB: 1,2,4-triklórbenzol

THDA: tuberohipofizeális-DAerg neuronok

TIDA: tuberoinfunduláris-DAerg neuronok

ZI: zona incerta

## 1. Bevezetés

A biológiai hálózati kapcsolatok jellemző rendszerösszefüggéseit az irodalom az ökológiai rendszereknél írta le először. Ilyen tipikus rendszerkapcsolaton alapulnak a tradicionális táplálkozási hálózatok, melyek az organizmusok közötti trofikus viszonyokra (primer konszumentek-predátor-préda) fókuszálnak (Ings et al., 2009). A populáció biológiából ismeretes hálózatokat képviselnek a parazita gazda hálózatok, melyek a préda-predátor speciális táplálkozási kapcsolataira koncentrálnak. Az ökológiai rendszerek specifikus nexusát képviselik a mutualista hálózatok, melyek nem *per se* populáció dinamikai, illetve a rendszerben áramló energia fluxusokon alapulnak, hanem alapvetően a propagulációs és beporzási stratégiák rendszerét képviselik (Ings et al., 2009).

A hálózatok a rendszerbiológiában esszenciálisak, melyeknek alapvető törvényszerűségei újszerű nézőpontokat képviselnek a biológiai kutatások eredményeinek prezentálása során. Jelen munkában ezen törvényszerűségek mentén kívánjuk vizsgálatainkat objektív módon közölni.

Definitív megközelítés szerint a rendszer nem más, mint egy jól lehatárolt közös „cél” érdekében együtt működő elemek hálózatos halmaza (Laszlo et al., 1998). A biológiai rendszerek az őket körülvevő, rájuk közvetlen hatást gyakorló, dinamikus környezetben léteznek. A biológiai rendszerek a környezetükkel szemben nyílt (disszipatív) rendszerek, abból a hálózatok fenntartásáért felelős inputokat vesznek fel (Kitano, 2002). Ezek lehetnek jelként értelmezhető inputok, amelyekből a biológiai rendszer outputokat állít elő és fenntartó inputok, amelyek a rendszer folyamatos változásának állandóságát biztosítják.

A rendszerszintű összefüggések értelmezése során kiemelt jelentősége van a *rendszer struktúrájának*, amely meghatározza a rendszeren belüli fiziológiai tulajdonságokat. A sejt, mint környezetével egyensúlytartásra képes nyílt rendszer, összetett hálózatok formációjaként jellemezhető, például gén regulációs-, protein-protein interakción alapuló, vagy a metabolikus útvonalakat leíró anyagcserehálózatokkal (Kitano, 2002; Jong, 2002). A *rendszer dinamika* határozza meg, hogy a változó külső feltételek mellett, az idő függvényében hogyan viselkedik a rendszer. A fenntartó mechanizmusok szabályozásához lényeges elem a sejt és/vagy magasabb komplexitás módszeres *kontrollja* (Endy, 2005).

A biológiai rendszerek robosztusak, melyeknek számos karakterisztikus pontja van. Első eleme az *adaptáció*, amely a környezeti változásokkal szembeni feedback mechanizmusokkal regulált (Westerhoff et al., 2004). Az *inszenzitivitás* a rendszer specifikus kinetikus paramétereivel szembeni állandóságát biztosítja. A *strukturális stabilitás* eredményeképpen a rendszerfunkciókat ért degradációk kevésbé terjedhetnek át az egyik rendszerelemről a másira. Ezt biztosítja a *modularitás* is, melynek eredményeképpen a vertikálisan értelmezett szerveződési elemek funkcionálisan és fizikailag is izolálttá válnak, így az egyes modulokban bekövetkező hiba is nehezen terjedhet át a rendszer többi elemére (Kitano, 2002; Westerhoff et al., 2004; Likic et al., 2010).

A rendszer további sajátossága a *komplexitás*, mely rendszer és környezete, valamint a rendszeren belüli interakciók dinamikus hálózataként és kapcsolataként írható le. Ebben a funkcionálisan diverz komponensek szelektíven és gyakran nem lineárisan lépnek kölcsönhatásba egymással, ezáltal koherens viselkedési mintázatot alakítanak ki (Jong, 2002). Egy dinamikus rendszer külső és/vagy belső struktúrája, e részobjektumok és interakcióik eredményeként írható le.

Az élő rendszerek adaptív potenciálját a fentiek alapján is, meghatározza a homeosztázis, a szervezet belső egyensúlyi állapota. A magasabb rendű élőlények a neuro-endokrino-immuno homeosztázis révén hatékony interakcióra képesek infra- és szupraindividuális környezetükkel, amelynek révén a szervezet belső homeosztatisz hálózatai dinamikusan követik a környezet változásait.

## 2. Kémiai környezetterhelések és az endokrin rendszer

### 2.1 Homeosztatisz diszruptor vegyületek

Az emberi társadalom igényei és szükségletei kielégítése érdekében környezetének tudatos átalakítására törekedett, melyhez kapcsolatosan a külső feltételek változásai által indukált belső (infraindividuális) válaszmechanizmusok modulálódása, eltolódása valósult meg. Környezetünket számos forrásból származó antropogén környezetterhelés érinti, melyek energia-anyag szerinti besorolásban fizikai, kémiai és biológiai jellegűek. Ezek az exogén tényezők a homeosztatisz folyamatok eltolásával, módosításával járó alkalmazkodási mintázatok megváltozását indukálják, amit számos nemzetközi publikáció igazol (Oehlman et al., 2000; Andrews et al., 1988). Az *endokrin diszruptor vegyületek* (EDC) a hormonháztartásra gyakorolt hatásaikkal olyan exogén ágensek, amelyek megzavarják a természetes hormonok szintézisét, szekrécióját, transzportját, célfehérjéhez való kötődését, receptor felismerését, eliminációját, ezzel strukturális rendszerzavart előidézve a biológiai rendszerekben (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Azonban a hormonok esszenciális mediátorként az organizmus szintjén a teljes homeosztatisz vertikumban, az anyagcserehálózatok működésében is részt vesznek, ezért az EDC vegyületeket *homeosztatisz diszruptor* (HD) ágensként szükséges értelmeznünk. Jelen munkában új fogalomként kívánjuk bevezetni a HD vegyületeket. Ezen állításunk igazolására néhány komplex EDC indukált hatásmechanizmust kívánunk vázolni.

A műanyagiparban széles körben használt biszfenol-A (BPA), valamint a felületaktív alkilfenol- etoxilátok előállításához használt oktilfenol (OP), mint xeno-ösztrogén hatású ágensek jelennek meg a nemzetközi szakirodalomban (Oehlmann et al., 2000). *Marisa cornuarietis* L. édesvízi csigafajon végzett kutatások során igazolták, hogy a BPA és OP vegyületek komplex morfológiai és fiziológiai elváltozásokat váltottak ki a női reprodukciós rendszerben (genitális rendszerben kialakult malformációk), valamint növelték a női egyedek mortalitását. Oehlmann és mtsai. (1996) által dokumentált tributilinnal expozíció eredményeként ugyanezen csigafaj hím- és nőstényegyedei imposex példányokká alakultak. *Nucella lapillus* L. tengeri csigafajban xeno-ösztrogén expozíció hatásaként fokozott oocita produkció, valamint a női ivarmirigyek



hipertrófiája volt megfigyelhető, e vegyületek ösztrogén-mimikus tulajdonságaik következtében (Schulte-Oehlmann et al., 2000).

A 25-200 mg/ts.kg/nap dózisban alkalmazott, metoxyklórral végzett kísérletek eredményeként megállapítottá vált, hogy a vizsgált patkányok F1 utódnemzedékében mind a nőstény és mind a hím egyedek tekintetében a fertilitás és a viabilitás csökkent tendenciát mutatott. Ezen változások az adenohipofízis (AdH) hormonok elválasztásának módosulásával értelmezhetőek, ugyanis a prolaktin (PRL), tireoidea-stimuláló- és folliculus-stimuláló hormonok szintje karakterisztikusan emelkedett (Gray et al., 1989).

További kutatások igazolták, hogy hexaklórbenzol (HCB) kezelések a kísérleti patkányok szérumában a koleszterol, alanin-aminotranszferáz enzim, 1,25-dihidroxi-D3 vitamin, valamint a parathormon szinteket szignifikánsan emelték a kontroll csoportokhoz viszonyítva (Andrews et al., 1988). Mindez a  $\text{Ca}^{2+}$  metabolizmus zavarához és a csontszövet demineralizációjához vezetett. Vizsgálatok szerint az m-, és o-diklórbenzol, 1,2,4-triklórbenzol (TCB), valamint ezek metil-szulfonát deriváltjai induktorként szerepelnek a II-fázisú metabolikus útvonalakban, valamint aktiválják az uridin-difoszfo-glükuronil transzferáz működését (Kato et al., 1988).

Ismeretes, hogy a pajzsmirigy hormonok kiemelt szerepet töltenek be a prenatális élet során az agy normál fejlődésében (Dussault et al., 1987). Álvarez-Pedrol és mtsai. (2008) munkájában az organoklór származékok (diklóro-difenil triklóro-etán /p,p'-DDT/,  $\beta$ -hexaklórociklohexán, poliklórozott-bifenilek) hipotalamusz-hipofízis-pajzsmirigy axisra gyakorolt modulációjára hívták fel a figyelmet.

Emlő tumorból származó MCF7-sejtvonalon, *in vitro* a BPA vegyületek ösztrogén receptorokhoz kapcsolódva ösztrogenikus hatást indukáltak (Olsen et al., 2003).

A biológiai fejlődés magasan integrált folyamat, amelyben generális protein és sejt szintű hálózatok működnek együtt, ennek esszenciális koordináló elemei a proliferáció, differenciáció, valamint az apoptózis (Rao et al., 2001). A proliferáció és differenciáció folyamatában a génexpresziós ráta dinamikus kinetikája révén mutagenikus, epigenetikus változások nagy gyakorisággal jelennek meg, amelyek a sejtek transzformációjában realizálódhatnak. A sejtek transzformációját a HD vegyületek triggerelhetik. McLahlan és mtsai. (1980) igazolták, hogy kísérleti egerekben prenatális dietil-sztilbösztrol expozíció uterus neopláziát indukált. A kései gesztációs periódusban patkány nőstény egyedek tamoxifen expozíciója szenzitivizálta az utód nemzedék egyedeit emlő tumorok kialakulásaira (Hilakivi-Clarke et al., 1999). A környezetterhelő

HD vegyületek *in utero* expozíciója az akut csecsemőkori leukémia kialakulását fokozta, a topoizomeráz-II enzim inhibíciója által (Alexander et al., 2001). Neuroepitélialis tumorindukció, neuroblasztóma, non-Hodgkin limfóma, Ewing szarkóma, gyermekkori osteoszarkóma, kolorektális karcinóma kialakulásában a peszticidek szerepe igazolt (Zahm et al., 1998).

A fenti példák jól alátámasztják, hogy az EDC vegyületek a homeosztázis modulálásával rendszerzavarokat idéznek elő.

## 2.2 HD vegyületek és az ionhomeosztázis

A HD vegyületek rendszerszintű zavarokat idézhetnek elő az ionhomeosztázis modulálásával is. A piretroidok, dihidro-pirazolok, oxidiazonok a feszültségkapuzott  $\text{Na}^+$ -csatornák különböző alegységeihez kapcsolódva prolongált membrán depolarizációt indukáltak az egyes kísérleti modellekben. A dihidro-pirazolok a feszültség vezérelt  $\text{Na}^+$ -csatornák inhibícióját idézik elő, azáltal, hogy a csatorna inaktivált állapotában kapcsolódnak hozzá (Raymund et al., 2005). Az organoklór származékok az aktivációs ráta csökkenését váltották ki az inaktiváció inhibitoraiként (O'Reilly et al., 2006). A feszültségkapuzott  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákon keresztül fokozzák a  $\text{Ca}^{2+}$  influxot, membrán depolarizációt indukálva (Restrepo-Angulo I et al., 2010).

A placenta szinciciotrofoblaszt sejtjeiben számos  $\text{Ca}^{2+}$  mediátor funkciót károsítanak az említett vegyületek (Hamel et al., 2003). A klórozott aliciklusos peszticidek (aldrin, dieldrin, heptaklór, lindán) a  $\gamma$ -amino vajsav ( $\text{GABA}_A$ ) receptor csatornákon keresztül fejtik ki hatásaikat (Goel et al., 2007). A  $\text{GABA}_A$  receptor- $\text{Cl}^-$  komplex aktiválódása esetén mind az intra-, és extracelluláris tér felé irányuló  $\text{Cl}^-$  mozgást tesz lehetővé, ezáltal stabilizálja a sejt nyugalmi membránpotenciálját, ami gátló jellegű impulzusként realizálódik. A klórozott policiklusos peszticidek gátolják  $\text{Cl}^-$ -csatorna nyitódását, ezáltal fokozzák a sejt excitabilitását (Bloomquist, 2003). A 2,3,7,8-tetraklóro-p-dioxin az ioncsatorna kapuzás kinetikáját változtatja meg (Jigyasi et al., 2013), ugyanis kísérletesen igazolt, hogy fokozza a  $\text{Ca}^{2+}$  influxot a T-típusú feszültségkapuzott  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornában. A 1,1,1-triklór-2,2-di (4-klórfenil) etán a kalmodulin protein gátlásával a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áz működését blokkolja (O'Reilly et al., 2006). A poliklórozott-bifenilek a mitokondriumokba, mikroszómákba történő  $\text{Ca}^{2+}$  belépést blokkolják, ezáltal

sérül a  $\text{Ca}^{2+}$  másodlagos messenger funkciója. Továbbá összetett enzimkomplex rendszereket aktiválnak, többek között a foszfolipáz-C (PLC), foszfolipáz- $\text{A}_2$  kommunikációs hálózatokat, melyek eredményeképpen az  $\text{O}_2^-$  generáló NADPH oxidáz aktivációja valósul meg (Mattason et al., 2003). Suvetha és mtsai. (2010) bizonyították, hogy a cipermetrin (szintetikus piretroid származék) hipokalémiát, valamint az ionhomeosztázis fenntartásáért felelős  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáz gátlását idézi elő.

### **2.3 A hipotalamo-adenohipofizeális komplexitás**

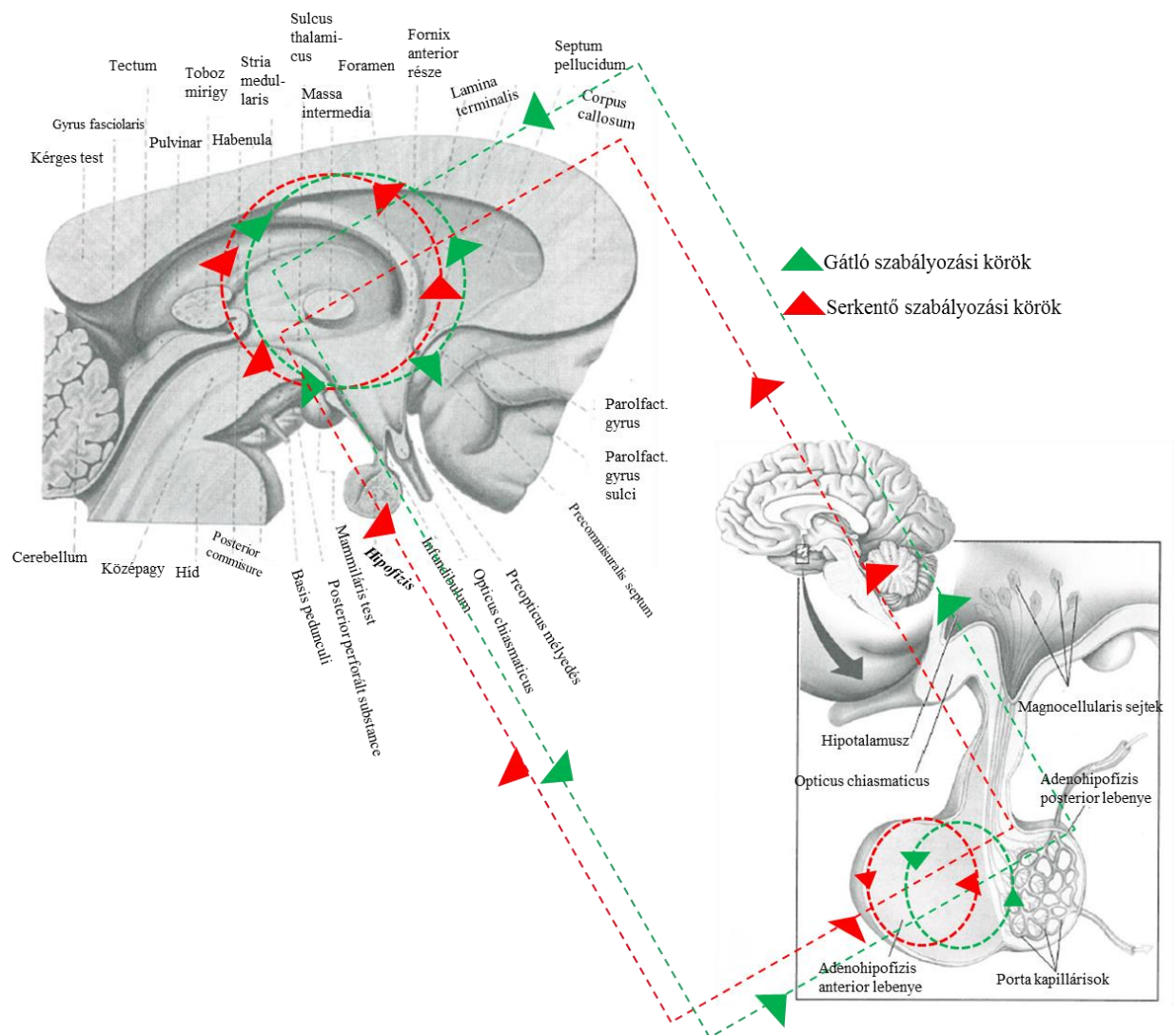
A hipotalamusz jelentős mediátor funkciót tölt be az endokrin, autonóm rendszer és a viselkedés szabályozásában. Többek között regulációs szerepet játszik a hormon elválasztás kontrolljában, a testhőmérséklet, a víz-, és táplálékfelvétel, a szexuális viselkedés, a reprodukció, a fiziológiai állapot napi ciklusának (cirkadián ritmus) fenntartásában, valamint az emocionális válaszok mediációjában (LeDoux et al., 1988; Schwartz et al., 2000; Davis, 1998). A hipotalamusz (1. ábra) a limbikus rendszer és a centrencephalon közé iktatott agyi struktúra. A diencephalon eleme, a ventriculus tertius területén helyezkedik el, melyet a talamusztól, a dorzális régióján elhelyezkedő sulcus hypothalamicus választja el. Ventrális felületén három kiemelkedő struktúra található: a pars chiasmatica, amely a chiasma opticum-ból és a körülötte elhelyezkedő szürkeállományból; a pars tuberalis, amely az eminantia mediana-ból (tuber cinereum), illetve a benne megjelenő magcsoportokból; a pars mamillaris, amelyet az agyalapon a tuber cinereum mögött ülő corpus mamillare épít fel (Schwartz et al., 2000; Saper et al., 2005).

A hipotalamusz és a hipofízis között kialakult kapcsolatok és/vagy függvényekkel jól jellemezhetők, hiszen e komplex rendszer funkcionális működését ki-be kapcsoltágú rendszerelemek írják le (serkentő és gátló faktorok révén). A pars chiasmaticus-t három endokrinológiai szempontból lényeges magcsoport alkotja, nevezetesen a nucleus supraopticus (NS), nucleus paraventricularis (NP), valamint a nucleus suprachiasmaticus. Itt a hormon transzport szempontjából kialakult struktúra a supraoptico-hypophysealis traktus, amely a NS-ban és NP-ban szintetizált arginin-vazopresszin (AVP) és oxitocin (OT) infundibulumon keresztüli neurohipofízisbe történő axonális transzportjáért felelős. A NP frakció a kortikotropin-releasing hormon

(CRH) termelésért felelős régió, az itt expresszáldott CRH a portális keringésen keresztül jut a hipofízis anterior lebenyébe (Larsen et al., 2003).

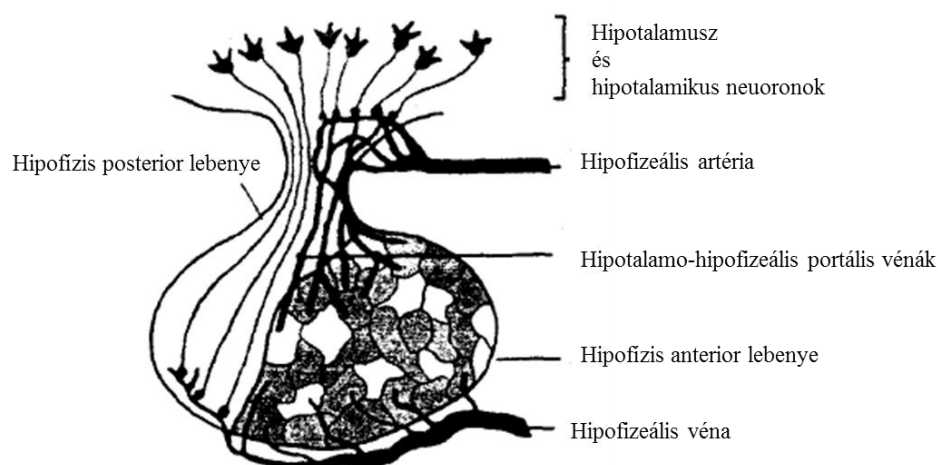
A pars tuberalist szintén három jellemző magcsoport alkotja: a nucleus dorsomedialis, a nucleus ventromedialis és a nucleus arcuatus. Az AdH endokrin funkcióinak betöltéséért ez utóbbi magcsoport a felelős, hiszen számos reguláló (releasing, inhibiting) faktort expresszál (Gross, 1984).

A harmadik magcsoport nem kapcsolódik szorosan az autonóm és endokrin funkciókhoz. Az itt található nucleus mammilaris medialis, nucleus mammilaris lateralis és nucleus intercalatus kapcsolatot mutat a limbikus rendszerrel, így pl. jelentős szerepet tölt be a memóriában (Larsen et al., 2003).



1. ábra A hipotalamo-hipofízeális komplexitás (Larsen et al., 2003 nyomán)

Az ektodermális eredetű agyalapi mirigy fejlődése már a korai gesztációs periódusban megkezdődik. Két fő területi egysége a neurohipofízis (NH), amely a diencephalon kitüremkedése révén jön létre, valamint az AdH, amely a stomodümből származik, pontosabban a Rathke-tasak, a szájüreg hámfjának kitüremkedése által fűződik le (Dotton, 1999). Az AdH fejlődése a 4. gesztációs hét közepétől kezdődik. Ekkor a sejtek osztódási turn-over-e olyan intenzívvé válik, hogy a stomodeum és Rathke-tasak kapcsolata a 6. gesztációs hétre teljesen megszűnik (Moore et al., 1998). A Rathke-tasak anterior részén lévő sejtek az AdH distalis elemét hozzák létre. Az itt található szomatotrop, kortikotrop, laktotrop, gonadotrop sejtek zömmel endokrin funkciót töltenek be, a hipotalamusz releasing és inhibiting faktorai jellemzően modulálják e sejtek működését (Dotton, 1999; Lopponen et al., 1998). A Rathke-tasak posterior részén a pars intermedia alakul ki, itt expresszálódik a proopiomelanokortin polipeptid. Az infundibulum alatt található a pars tuberalis, itt módosult endimasejteket (taniciták) találunk, amelyek a tobozmirigy és PRL termelő sejtek között teremtenek kapcsolatot (Sanchez et al. 2009). A hipofízis artériás vérkeringésért felelősek az arteria carotis interna ágai, a hypophysealis superior media és inferior. A vénás portális rendszer, az eminentia mediana-tól az AdH elülső lebenyéig húzódik. A primer kapilláris (2. ábra) plexust az eminentia mediana területén létrejött hurok kapillárisok képezik. E rendszerbe ömlenek a hipotalamusz által termelt neuroszekrétaanyagok. Ezt követően a plexus portális vénákba rendeződik, majd az AdH sejtjei között kapillarizálódik (Moore et al., 1998; Bergland et al., 1970). E porta-rendszernek lényeges szerepe van hipotalamusz és a hipofízis közötti kommunikáció kialakításában.



2. ábra A hipofízis vaszkularizációja és innervációja (Dotton, 1999)

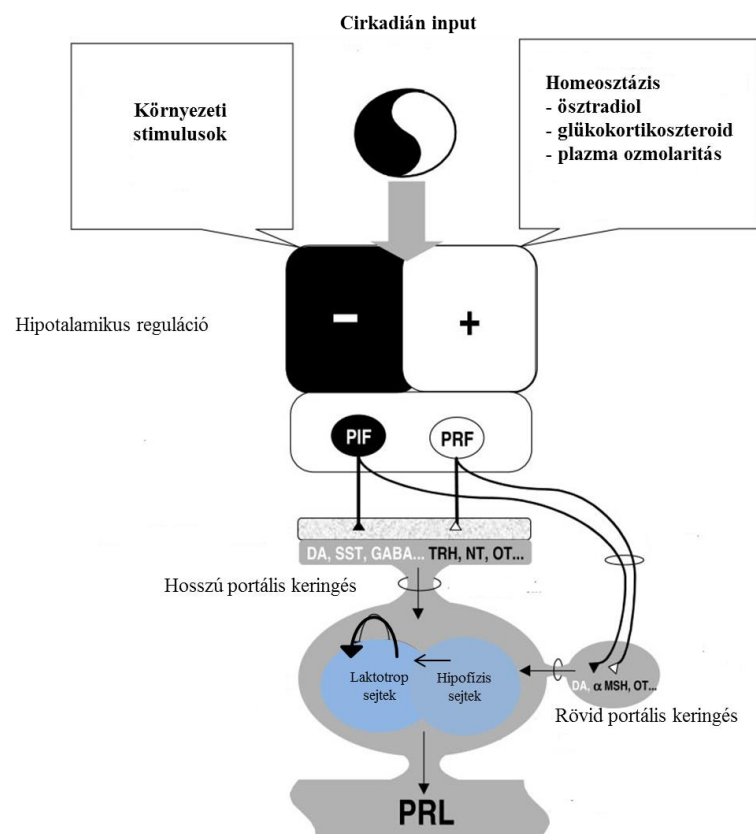
A NH az 5.-6. gesztációs héten kezdi meg a fejlődését, mely a diencephalon ektodermájának neurohipofizeális rügyéből fűződik le (Dotton, 1999). A NH három fő részegységei: az eminentia mediana hypothalami, az infundibulum (hipofízisnyél), valamint a pars nervosa. Lényegesek a neuroepitélialis sejtekből differenciálódó neuroglia sejtek, a pituiciták. A NS-ban és NP-ban lokalizált magnocelluláris neuronok e sejtekbe transzportálják a szekretált AVP-t és OT-t, ugyanakkor a pituicitákban található neurosecretosomák nem csupán az ide szállított, hanem az autoreguláció révén a pituiciták saját maguk által termelt hormonok raktározását is végzik (Larsen et al., 2003; Valkusz et al., 2011).

## **2.4 Prolaktin szekréció szabályozása**

A PRL génje a 6. kromoszómán található, a gén 5 exon és 4 intron által felépített, melynek transzkripciója 2 independens promóter régió által regulált. A humán PRL DNS szakasz 914 nukleotid hosszúságú, tartalmaz egy 681 nukleotid hosszúságú open-reading frame szakaszt, amely a PRL prohormon szintéziséért felel (Clapp et al., 1994). A hipofízis anterior lebenyének lateroventrális részén található laktotrop sejtelei termelik a PRL-t. A sejteket heterogén, polyhedrális sejthalak jellemzi (Freeman et al., 2000). Az AdH külső zónájában található laktotrop sejtek thyrotropin-releasing hormonra (TRH), a belső zónában azonban dopamin (DA) érzékeny sejtek fordulnak elő nagyobb abundanciával (Chinta et al., 2004; DeMaria et al., 1999). Függetlenül az agyalapi mirigyben szintetizált PRL-től a hipotalamusz dorzomediális, ventromediális, supraoptikus és paraventrikuláris magvaiban is expresszálódik. E centrális eredetű PRL szerepe nem teljesen tisztázott, valószínűsíthető, hogy neurotranszmitter, neuromodulátor, centrális citokin szabályozó vaszkuláris növekedési faktor funkciókat tölthet be (Freeman et al., 2000).

A PRL szabályozásában számos releasing és inhibiting faktor játszik kulcsszerepet (3. ábra). A rendszerszintű megközelítés értelmében az infra-és szupraindividuális környezet módosulásai a hipofizeális PRL elválasztását triggerelik. Ilyen külső serkentő környezeti inger pl. a stressz, vagy a szopási inger. Homeosztatisz releasing faktor a TRH, melynek receptora magasan expresszált a laktotrop sejtek plazmalemmájában (Matsushita et al., 1982). Az aktivált hormon-receptor komplex GTP

(guanozin-trifoszfát) kötő proteineket aktivál, vagyis  $G_s$ ,  $G_q$ ,  $G_{11}$  proteineket, melyek mediálják a PLC működést, amely inozitol-trifoszfát (IP<sub>3</sub>) és diacilglicerol (DAG) felszabadítása mellett jelentős  $Ca^{2+}$  influxot indukál, ezzel elősegítve a PRL exocitózist (Freeman et al., 2000). Az OT nagy dózisban szintén serkentő impulzusként hat. Az AVP *in vivo* a  $V_1$  receptorokon keresztül potenciózza a PRL szekréciót (Hanew et al., 1980). Az angiotenzin II AT<sub>1</sub> receptorokon keresztül  $Ca^{2+}$  mobilizációs útvonal közvetítésével stimulálja a PRL elválasztását (Ichiki et al., 1995). A neurokinin-A, -B (P-anyag család tagjai) a  $G_q$  által aktivált útvonalakon keresztül serkentik a PRL szekrécióját (Regoli et al., 1994). A neuropeptid Y (pankreász polipeptid család tagja) a  $G_0$ ,  $G_i$  mediációs útvonalakon szabályozza a PRL elválasztását (Rettori et al., 1990).

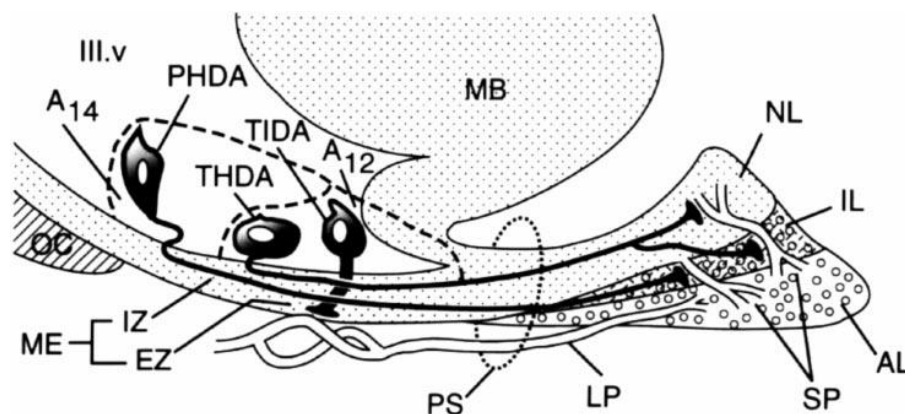


3. ábra A prolaktin elválasztás szabályozása (Freeman et al., 2000 nyomán)

PIF: prolaktin inhibiting faktor, PRF: prolaktin releasing faktor, DA: dopamin, SST: szomatosztatin, GABA:  $\gamma$ -amino-vajsav, TRH: tireotrop-releasing hormon, NT: neurotenzin, OT: oxitocin,  $\alpha$ -MSH:  $\alpha$ - melanocita-stimuláló hormon

A legjelentősebb inhibiting faktor a DA. A laktotrop sejtek membránjában a  $D_2$  receptorok magasan expresszáltak (Moore, 1987). A neuroendokrin kommunikációban

jelentős DAerg neuronok az A1-A15 katekolaminerg neuron populációk közül kerülnek ki (4. ábra). A hipofízisbe a mediális, bazális, periventrikuláris magvak neuronjai (A14, A12) szállítják a DA-t (DeMaria et al., 1999). Ezek a neuronok vagy közvetlenül küldenek rostokat az eminentia mediana externális zónájába, vagy axon kollaterálisokat küldenek az internális zónán keresztül a hipofízis poszterior lebenyébe, ahonnan a DA portális keringés révén jut el a célsejtek receptoraihoz. 3 anatómiailag és funkcionálisan is különböző neuron-szisztéma vezérli a neuroendokrin DA kommunikációt. A periventrikuláris-hipotalamikus-DAerg neuronok (PHDA) a periventrikuláris magvakban lokalizáltak, axonjuk az agyalapi mirigy intermediális részében végződik. A tuberohipofízeális-DAerg neuronok (THDA) az agyalapi mirigy neurális és intermediális részében végződnek, míg a tuberoinfundibuláris-DAerg neuronok (TIDA) az agyalapi mirigy externális részében végződnek (Chinta et al., 2004).



4. ábra Neuroendokrin dopaminerg neuronok (Freeman et al., 2000)

PHDA: periventrikuláris-hipotalamikus-DAerg neuronok, TIDA: tuberoinfundibuláris-DAerg neuronok, THDA: tuberohipofízeális-DAerg neuronok, MB: mamilláris test, NL: hipofízis neurális lebenye, IL: a hipofízis internális lebenye, AL: a hipofízis anterior lebenye, PS: rövid portális keringés, LP: hosszú portális keringés, IZ: internális zóna, EZ: externális zóna

A PRL szekréció gátlása a  $D_2$  receptorok által közvetített szignál-transzdukciós útvonalakon keresztül valósul meg. [DA- $D_2$ ] komplex aktiválja a  $G_{i3\alpha}$  proteineket, amelyek gátolják az adenilát-cikláz enzim működését, mely az inozitol-foszfát metabolizmusát is blokkolja. Ezáltal az exocitózishoz szükséges  $Ca^{2+}$  influx nem valósul meg, tehát a PRL exocitózis nem játszódik le. E folyamatok mellett a DA másik

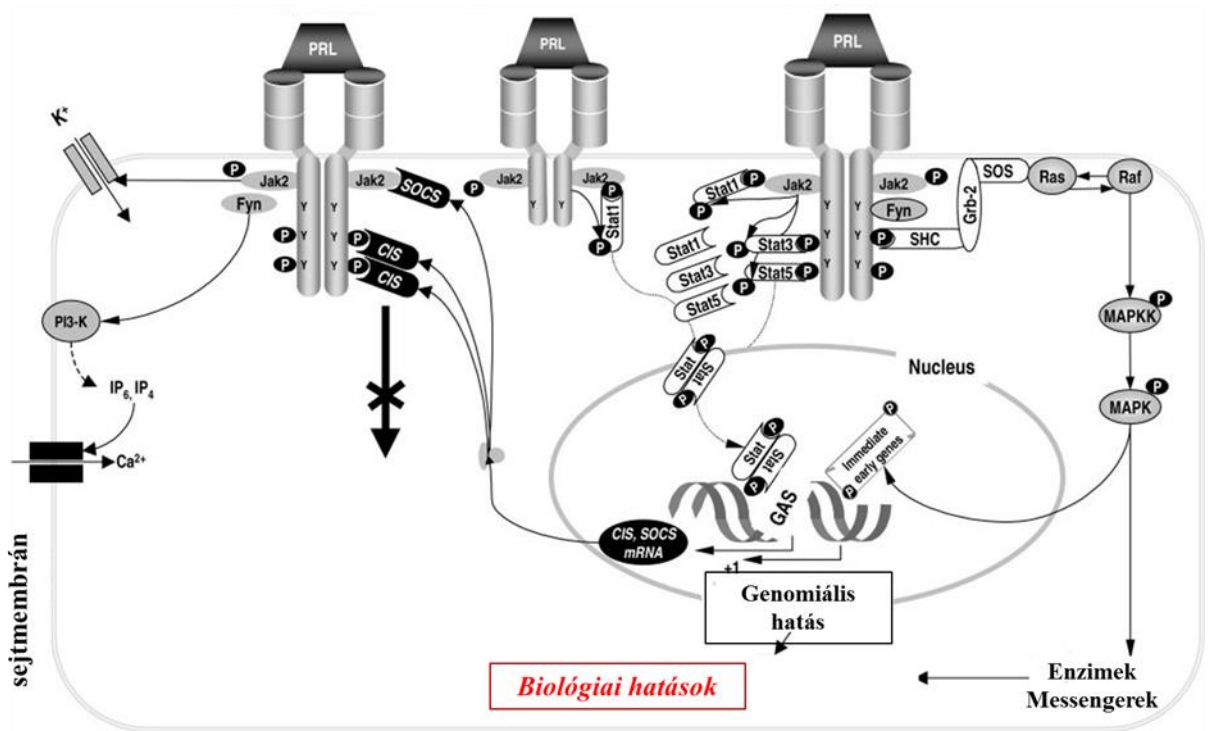


hatása, hogy aktiválja a  $K^+$ -csatornákat, ezáltal a sejtmembránt hiperpolarizált állapotba hozza, mely gátló potenciálként realizálódik (Chinta et al., 2004; Siegel et al., 2006).

## 2.5 Prolaktin és szignál-transzdukció

A PRL biológiai hatását a célsejtek felszínén expresszált receptorai által közvetített szignál-transzdukció útján fejt ki (5. ábra). A PRL receptorok (PRL-R) tirozin kinázok, melyek tirozin maradékokat képesek foszforilálni. A jelátviteli útvonal ligandum által indukált receptor dimerizáció révén kezdődik meg (Somers et al., 1994; Freeman et al., 2000). Minden PRL molekula két kötőhelyet tartalmaz, az iniciális [hormon-receptor]-komplex indukálja a második kötőhely interakcióját a PRL molekulával (Freeman et al., 2000). A PRL-R intracelluláris doménjai két jól konzervált, prolin gazdag box-1, box-2 régióval rendelkeznek, melyek a Janus-arcú, kettős specifitású tirozin kináz (Jak2) aktivációhoz nélkülözhetetlenek (Verma et al., 2003). A Jak2 molekulák, melyek tirozin és treonin oldalláncot is képesek foszforilálni, konstitutíven asszociálnak az intracelluláris doménekhez, majd transzfoszforilálják egymást, ezzel megindítva jelátviteli útvonalakat. A fő transzducer a Stat protein család, elsősorban a Stat1, Stat3, Stat5a, Stat5b (O'Shea et al., 2002). Minden Stat molekula tartalmaz 1 DNS kötő domént, egy SH3-szerű domént (amellyel a jelátviteli molekula prolin gazdag régiójához kapcsolódik), egy SH2-domént (amely az autofoszforilálódott tirozin oldalánchoz kapcsolódik), egy  $NH_2^-$  és  $COOH^-$  terminális transzaktivációs domént. Amint a receptorhoz kapcsolódik foszforilálódik és aktív válik a Jak2 kináz által (O'Shea et al., 2002; Kisseleva et al., 2001). A foszforilált Stat molekula ledisszociál a receptorról és hetero-, vagy homodimerizálódik a saját foszfo-tirozin csoportján keresztül egy másik foszforilált Stat molekula SH2 doménjével. Ezt követően az aktív dimer transzlokálódik a nukleuszba, ahol aktiválja a Stat-DNS kötő motívumot a célgének promoterében (Freeman et al., 2000; Qian et al., 2009). A Stat mellett más szignál-transzdukciós útvonalak is aktiválódhatnak, így a MAPK kaszkád rendszer is. Ehhez adapter proteinekre van szükség, így Shc/Grb2/Sos (szabályozó proteinek) proteinek, melyek a Ras/Raf (transzkripciós faktorok) által indukálják a MAPK rendszert (Chang et al., 1997; Bole-Feysot et al., 1998). A sejtek univerzális másodlagos hírvivői az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -ok, melyek a Fyn tirozin protein kináz

közreműködésével aktivált ioncsatornákon áramolnak az intracelluláris térbe. A folyamat inhibitorai a citokin-szignál szupresszorok (SOCS), valamint citokin indukált SH2-tartalmú proteinek (CIS). A SOCS-1 molekulák SH2 doménje képes hozzá kapcsolódni a Jak2 kináz N-terminális doménjéhez, mellyel a tirozin foszforiláció gátlódik. A CIS molekulák célproteinjei elsősorban a Stat molekulák, melyek tirozin maradványaihoz kapcsolódva fejtik ki inhibíciójukat (Herrington et al., 2001).



5. ábra Prolaktin által kiváltott szignál transzdukciós útvonalak (Freeman et al., 2000 nyomán)

PRL: prolaktin, JAK2: Janus-arcú kináz, Stat: szignál transzducer és transzkripció aktivátor protein, adapter fehérjék (szabályozó fehérjék): Shc, Grb2, Sos, MAPK: szerint/treonin protein kináz, SOCS: citokin-szignál szupresszorok, CIS: citokin indukált SH2-tartalmú protein, Fyn: tirozin protein kináz, PI3K: foszfatidil-inozitol-3 kináz

## 2.6 Laktotrop adenoma

A prolaktinómák (PRLoma) a leggyakrabban előforduló hipofízis eredetű adenómák, melyek a laktotrop sejtek transzformációjára vezethetők vissza és a PRL hiperszekréciójában manifesztálódnak (Spada, 1998; Karaca et al., 2010).

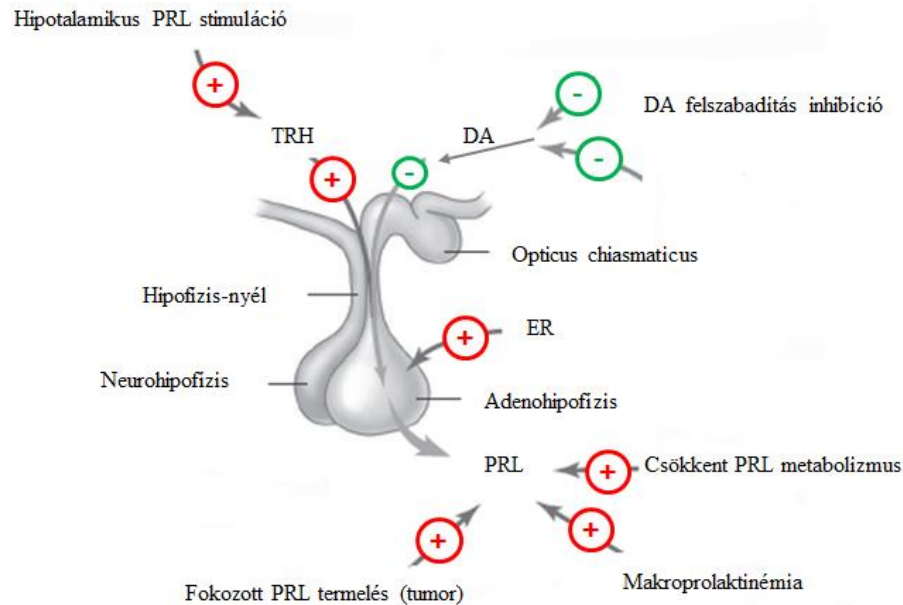
Epidemiológiai adatok szerint a hipofízis adenómák mintegy 40 %-át teszik ki, ennek 90 %-a mikroprolaktinóma. A hiperprolaktinémia fiziológiai okai között szerepelnek a terhesség, a stressz, az emlő mirigy stimulálása; a farmakológiai dimenziók közé sorolhatjuk az antikonceptív szerek fokozott használatát (Le Moli et al., 1999; McChesney et al., 1991; Charoenphandhu et al., 2008.). A hipofízis eredetű karcinómák meglehetősen ritkák, Kars és mtsai. (2006) munkájában mintegy 140 esetet dokumentáltak, melynek 1/3-a malignus prolaktinóma.

Az agyalapi eredetű tumorok kialakulásában a hipotalamikus stimulusok feltételezhetően jelentős szerepet játszanak (Bole-Feysot et al., 1998). Hipotalamikus stimuláló faktorok a target hipofízis sejtek fokozott proliferációját eredményezik (6. ábra). Szakirodalmi adatok alapján adenohipofizeális hiperplázia növekedési-hormon releasing-hormon, valamint CRH hatására igazolt (Casanueva et al., 2006). A laktotrop sejtek igen erős DAerg szabályozás alatt állnak, így monoamin-oxidáz inhibíció, triciklusos antidepresszánsok alkalmazása, szerotonin inhibitorok is okolhatóak PRLoma kialakulásáért (Aron et al., 2000). Mivel az adenohipofízis összetett szabályozás alatt áll, ezért a neurokrin reguláció mellett (Igarashi-Migitaka et al., 2003), a hipotalamuszból származó stimulusok, mint PRL-releasing faktorok, valamint a perifériáról származó ingerek, mint az ösztrogén is szerepet játszhatnak laktotrop adenómák kialakulásában (Edwards et al., 2005). A referált szakirodalmak alapján megállapítható, hogy az ösztrogén ER $\alpha$ , ER $\beta$  receptorokon keresztül ERK1-2/MAPK útvonalakat triggerelve stimulálja a PRL szintézisét és expresszióját (Visser-Wisselaar et al., 1997; Brann et al., 1988). Fokozza továbbá a sejtek energiarendszereit is, a feszültségfüggő Ca<sup>2+</sup>-csatornák kapuzásának modulálásával, Ca<sup>2+</sup> influxot előidézve (Lieberman et al., 1978; Kow et al., 2009).

Vannak esetek, amikor a magas PRL szint makroprolaktinémia által magyarázható. Kialakulása során egy monomer PRL molekula egy többnyire bioaktivitással nem rendelkező proteinhez kapcsolódik (leggyakrabban immunglobulin molekulához), PRL-autoantitest komplexet létrehozva, amely potenciózza a szóban forgó hormon elválasztását (Freeman et al., 2000; Ciccarelli et al., 2005).

A PRLoma klinikai tünetei között nőknél galactorrea (az emlőbimbó váladékozása), amenorrea (menstruáció elmaradása), vagy oligomenorrea (szabálytalan menses) szerepelnek. Férfiak esetében fejfájás, vizuális diszturbancia, ginekomasztia (emlőszövet megnagyobbodása), valamint galactorrea figyelhető meg. PRLomában

szenvedők fogékonyabbak oszteopénia, oszteoporózis kialakulása iránt, mely a  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis zavarára vezethető vissza (Johnson et al., 2003).



6. ábra Prolaktinóma kialakulásának okai (Serri et al., 2003 nyomán)

PRL: prolaktin, TRH: tireotrop-releasing hormon, DA: dopamin, ER: ösztrogének

A tumorok fejlődésében kulcsszerepet játszanak bizonyos növekedési faktorok. A laktoszomatotrop sejtek növekedési faktorok hatására növekedési hormon (GH) termelő szomatotrop, valamint PRL szekretáló laktotrop sejtekké differentálódnak (Colao et al., 1998). A GH és PRL közös eredetére utal a molekulák szerkezetének, szignál-transzdukciós útvonalainak hasonlósága. A GH receptor extracelluláris, 7 transzmembrán és intracelluláris doménból épül fel. GH ligand kötő helyhez történő asszociációja során a receptor dimerizálódik, majd az intracelluláris domén box-1-hez kapcsolódik a tirozin kináz Jak2, mely foszforilálással aktiválódik (Herrington et al., 2001). A szignál-transzdukció több útvonalon is lejátszódhat: Stat molekulák, illetve Ras-MAPK által közvetített módon, ahol az adapter protein az Shc (Tollet-Egnell et al., 1999).

## 2.7 ACTH szekréció szabályozása

Az AdH-ben található kortikotrop sejtek igen erőteljes hipotalamikus kontroll alatt állnak (Larsen et al., 2003; Liu et al., 2003; Gibbs et al., 1986). A hipotalamusz CRHerg neuronjai a NP parvocelluláris magcsoportjaiban helyezkednek el, axonjaik az eminantia mediana kapillárisurkain végződnek (Hauger et al., 2006). A CRH egy 196 aminosavból álló preprohormonként szintetizálódik, melyből a prehormon-konvertáz 1,2 hasítja le, az igen konzervatív, 41 aminosavból álló CRH-t. A kortikotrop sejtek felszínén megtalálható CRH-R1 receptorok a negatív és pozitív feedback mechanizmusok működésért felelősek. Ezzel szemben a CRH-R2 $\alpha$  a hipotalamusz ventromediális magvaiban, a lateralis septumban, a CRH-R2 $\beta$  receptorok az arteriolák falában, a szívizomban, vázizomban, gyomor bélrendszerben találhatóak meg (Karalis et al., 2004).

Az AdH-ben szintetizált 39 aminosavból álló adrenokortikotrop hormon (ACTH) a proopimelanokortinból, mint prehormonból alakul ki alternatív splicing mechanizmusok során (Beuschlein et al., 2001). A szintetizálódó ACTH lényeges szerepet tölt be a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese cortex tengely (HPA axis) működésében (Bornstein et al., 1999). A cortex sejtjeinek felszínén magasan expresszáltak a G-protein kapcsolt a melanokortin 2-receptorok (ACTH-receptorok), melyek egy rövid NH<sub>2</sub>-terminális extracelluláris, 7 transzmembrán-doménből, valamint egy rövid COOH-terminális intracelluláris doménből épülnek fel (Lotfi et al., 2000). Az intra- és extracelluláris domének egy hordószerű konformációt alakítanak ki a membránban, melynek közepén a ligand kötő hely található. ACTH molekulák a ligand kötő helyhez történő asszociációja G-protein, majd adenilát cikláz stimulációt eredményez, ezzel az intracelluláris másodlagos messenger ciklikus 3'-5'-adenozin-monofoszfát (cAMP) koncentrációja megemelkedik (Beuschlein et al., 2000; Yang et al., 2007). Mindez generikus változásokat indukál a HPA axis hálózatában, mely fenntartja a stressz válaszáért, fertőzések leküzdésért felelős homeosztatikus egyensúlyt. Akut és/vagy krónikus stressz indukált HPA axis, a hipotalamikus CRH és AVP release által generált ACTH elválasztással válaszol, mely az adrenális cortex szteroidogenikus válaszkészségét fokozza (Bornstein et al., 2008; Legros, 2001). Magas ACTH koncentráció epizodikus kortizol hiperszekrécióban nyilvánulhat meg, mely a Cushing-szindrómában már igazolt (Sarkar et al., 2001).

Az ACTH hiperexpressziója a kortex szöveteiben proliferatív hatással bír, tehát a mellékvese kéregben hipervaszcularizációt, celluláris hipertrófiát, hiperpláziát vált ki. Karakterisztikus növekedési faktorokat, mint a fos (c-fos, FosB, Fra1, Fra2), valamint Jun (c-jun, junB, junD) proteincsaládokat aktivál (Karalis et al., 2004; Chesnokova et al., 2002). E proteinek ERK1/2, MAPK tirozin-kináz receptorok által potenciózott szignál-transzdukciós útvonalakat támogatnak, melynek eredményeképpen működésbe lép az aktivátor-protein 1 (AP1) transzkripciós faktor. Az AP1 kritikus szerepet játszik peptid növekedési faktorok, mint például FGF2 (fibroblast-növekedési-faktor-2) aktiválásában, valamint a G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S sejtciklusok tranzíciójában (Lotfi et al., 2000; Forti et al., 2006).

## **2.8 Homeosztatikus anyag-energiaháztartás hálózatok**

A homeosztázis energetikai rendszereinek tanulmányozását munkacsoportunkban korábban az orexinek *in vivo* és *in vitro* vizsgálatával is tanulmányoztuk, mely munkákból származó empirikus kutatási eredmények jelen munkám *in vitro* metodikai hátteréhez nyújtottak segítséget (Kis et al., 2011; Ocskó et al., 2012). A sejtek anyag-energia folyamataiban a neuropeptidek közé sorolható orexin-A és orexin-B jelentős szerepet játszanak. E molekulák a 17q21 kromoszómán lokalizált prepro-orexin génről expresszáldó prepro-orexinből proteolitikus folyamatok eredményeként keletkeznek (Ohno et al., 2007). Az orexin-A 33 aminosavból épül fel, melynek N-terminális vége piroglutamát rezidumot tartalmaz, C-terminális vége amidált, valamint két láncközi diszulfid-hídból épül fel. Ezzel szemben az orexin-B 28 aminosavból felépülő lineáris molekula (Kunii et al., 1999). Orexin szenzitív neuronok specifikusan lokalizáltak a laterális hipotalamikus területen (LHA), valamint a zona incerta mediális régiójában (ZI). Ezek a neuronok diffúz módon innerválják a teljes neuroaxist, beleértve a cerebrális kortext, a cirkumventrikuláris szerveket, és a limbikus rendszert érintő monoszínaptikus projekciókat (Kunii et al., 1999). Az ozmoszenzitív LHA, ZI területek különösen lényeges szerepet játszanak a folyadék-háztartás regulációjában. E régiók elektromos, kémiai stimulációja fokozza a vízfelvételt (Sakurai et al., 1998). Orexinek intracerebroventrikuláris injektálása a kísérleti állatokban folyadék felvevő viselkedést indukált, továbbá a dehidratáció serkenti a prepro-orexin mRNS expresszióját az

említett agyi területekben, mindez igazolja azt a tényt, hogy az említett neuropeptidek a fluid homeosztázis fiziológiás regulátorai (Kunii et al., 1999).

Az említett orexin molekulák fiziológiás hatásait G-protein kapcsolt  $OX_1$  ( $OX_1R$ ),  $OX_2$  ( $OX_2R$ ) receptorokkal való asszociációjuk során fejtik ki (Haynes et al., 2000). Az orexin-A az  $OX_1R$ -hez nagyobb affinitással kapcsolódik, mint az orexin-B, ezzel szemben az  $OX_2R$  non-szelektív. Mint G-protein kapcsolt receptorok modulálják a G-protein kapcsolt  $Ca^{2+}$  és a G-protein kapuzott belsőleg egyenirányított  $K^+$ -csatornákat, ezáltal a monoaminerg neuronokban excitatórikus aktivitást idéznek elő, patkány kísérletekben igazolták, hogy a hídban elhelyezkedő monoaminerg magban, a locus coeruleus-ban a hipokretinek depolarizálják a sejtek membránját, ezáltal fokozzák a kálium konduktanciát (Yamanaka et al., 2003).

## **2.9 A sejtek ion homeosztázisa**

A sejtek működését, az endo-, és exocitózis mechanizmusát az extracelluláris ion milieu jellemzően meghatározza. A sejt a környezetével egyensúlytartásra képes nyílt rendszer, így munkát végez, tehát az energetikai viszonyai jól értelmezhetőek. A citózisokat, mint makroállapotokat jellemzően domináns mikroállapotok valósítják meg. Ilyen az entrópiaváltozással járó, spontán folyamat a töltésvándorlás a membrán két oldala között, melyet a membránban található ioncsatornák tesznek lehetővé. Mind a kortikotrop, mind a laktotrop sejtekben spontán módon elektromos membránpotenciál fluktuáció alakul ki (Goor et al., 2001).

A plazmalemma két oldala közötti feszültségkülönbség kialakulásáért döntően a  $Na^+/K^+$  ionpumpa mechanizmus a felelős. E mechanizmus eredményeként a sejt  $K^+$ -ot halmoz fel a belső oldalon,  $Na^+$ -ot pedig az extracelluláris oldalon (Blanco et al., 1998). A membránban jelen levő, a  $K^+$ -ok passzív vándorlását lehetővé tevő  $K^+$ -csatornák a koncentráció gradienseknek megfelelően az extracelluláris térbe juttatják a  $K^+$ -okat, így a membrán belső felszíne a külsőhöz képest elektronegatív válik (Shao et al., 1999; Goor et al., 2001). Ha az így kialakuló membránpotenciál eléri a mínusz 70-től mínusz 100 mV-ot, akkor az elektromos potenciálgradiens kiegyenlíti az ellentétes irányú  $K^+$ -koncentrációgradienst, azaz a membrán nyugalomba kerül, ezt nevezzük nyugalmi

membránpotenciálnak (Stojilkovic et al., 2010). Ebben az állapotában közel van a  $K^+$  egyensúlyi potenciáljához.

A generátorpotenciál hatására a zsilipezett  $Na^+$ -csatornák kinyílnak, így az extracelluláris térben felhalmozott  $Na^+$ -ok intenzíven áramolnak az intracelluláris térbe, így a membrán polarizációja megfordul (Stojilkovic et al., 2010). Az akciós potenciált követő depolarizáció jelenti a sejtek serkentő excitatórikus potenciálját (Ceccarelli et al., 1988). Az akciós potenciál viszonylag rövid ideig tart, újabb csúcspotenciál csak akkor következhet be, ha a  $Na^+$ -csatornák az inaktivált állapotból zárt állapotba jutnak (Blanco et al., 1998). Normál laktotrop és korticotrop sejtekben a kialakult akciós potenciál frekvenciája alacsonyabb, mint a neuronokban. E csatornák közvetlenül nem nyithatók, vagy zárhatóak, mert az aktivációt követően refrakter periódusban vannak (Stojilkovic et al., 2010). Nyugalomban az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció meglehetősen alacsony, azonban a kialakult akciós potenciál triggereli a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  ioncsatornákat, így az extracelluláris tér felől jelentős  $Ca^{2+}$  áramlik az intracelluláris térbe (Goor et al., 2001; Ritchie, 1985; Shipston et al., 1996). E  $Ca^{2+}$  többlet az intracelluláris  $Ca^{2+}$ -raktárak rianodin receptorait nyitja meg, aminek eredményeképpen a koncentrációgradiens mentén  $Ca^{2+}$ -ok lépnek ki az intracelluláris térbe (Feinshreiber et al., 2009).

A serkentő potenciál mellett létrejöhet inhibítoros potenciál is, ebben az esetben hiperpolarizációról beszélünk. Hiperpolarizációban a  $K^+$ -ok kulcsszerepet játszanak, hiszen a feszültségfüggő  $K^+$ -csatornák által lehetővé válik a  $K^+$ -ok gyors kiáramlása az extracelluláris tér irányába, melynek eredményeképpen a belső tér a külsőhöz viszonyítva elektronegatívává válik (Stojilkovic et al., 2010; Tejada et al., 2002; Wong et al., 1982). Laktotrop sejtek esetében ilyen gátló potenciál DA hatására alakul ki. DA által stimulált  $D_2$  receptorok gátolják a  $Ca^{2+}$ -dependens akciós potenciált, ennek oka a  $K^+$ -konduktancia által mediált membrán potenciál hiperpolarizációja (Siegel et al., 2006; Einhorn et al., 1991).

Az AdH sejteiben több  $K^+$ -csatorna típus figyelhető meg. A belsőleg egyenirányított  $K^+$ -csatornák a hiperpolarizáció alatt, a steady state állapot fenntartása érdekében  $K^+$  influxot valósítanak meg, továbbá részt vesznek a nyugalmi membránpotenciál kontrolljában (Shieh et al., 2000; Shao et al., 1999). E típusú csatornák között megtalálhatjuk a klasszikus belsőleg egyenirányított  $K^+$ -csatornákat ( $Kir_{1,2,4,5,7}$ ), melyek intracelluláris messengerekkel szabályozottak,  $Kir_3$ -csatornákat, melyek G-proteinekkel kapcsolatosak, valamint a  $Kir_6$ -csatornákat, melyek intracelluláris ATP molekulákkal



szabályozottak. Szakirodalmi adatok alapján a feszültségkapuzott  $K^+$ -csatornák 4 fő típusát találhatjuk meg a hipofízis sejtjeiben, a gyorsan és lassan aktiválódó, késleltetett egyenirányító-, az A-típusú-, valamint az ether-a-go-go típusú  $K^+$ -csatornákat (Doyle et al., 1998; Wu et al., 2001; Camacho et al., 2005). A  $Ca^{2+}$  aktivált- $K^+$ -csatornák 2 típusa figyelhető meg; a  $Ca^{2+}$ -aktivált kis csatornák ( $K_{Ca2,1; 2,2; 2,3}$ ), valamint a közepes konduktanciájú  $K^+$ -csatornák ( $K_{Ca3,1}$ ) (Goor et al., 2001; Shipston et al., 1996). Az említett ioncsatornák membrán excitabilitásának, valamint az asszociált  $Ca^{2+}$  influx csökkenésének elemei, amely során gátlódik  $Ca^{2+}$  mobilizáció által vezérelt hormon tartalmú membrán vezikulák és a plazmalemma asszociációja.

## 2.10 Hipokalémia és az apoptózis

Az apoptózis, vagy programozott sejthalál esszenciális szerepet játszik a szervezet egyensúlyi folyamatainak fenntartásában, a növekedés-fejlődés szabályozásában, az immunválaszok regulálásában, valamint az abnormális sejtek eliminálásában. Az apoptózis indukciója számos faktor kooperációját igényli, többek között pro-apoptotikus proteinek, receptorok, enzimek és gén-reguláló proteinek összhangját (Kiess et al., 1998). Szakirodalmi adatok szerint alacsony  $[K^+]$  - *in vitro*- cerebelláris neuronok apoptózisát indította (Tejada et al., 2002).

Ha az extracelluláris környezet hipoionias állapotba kerül öregedési folyamatok indulhatnak meg. Hipokalémia hatására MAPK mediált tirozin-kináz foszforiláció játszódik le, melynek első lépése az apoptózis-szignál-reguláló kináz (ASK1) aktiválódása (Tsai et al, 2012). Ezen folyamatok kulcselemei a stressz kináz, C-Jun-N terminális kináz heterodimerizálódásának. Ezzel párhuzamosan fokozott p38 protein aktivitás figyelhető meg (Nakamura et al, 2012).

Az apoptózis kaszkád mechanizmusában a Bcl-2 molekulacsalád kiemelt szerepet játszik, melyek lehetnek anti-apoptotikus (emlősökben: A1/Bfl1, Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, Boo/Diva, Mcl-1, NR-13, Nrf3), illetve pro-apoptotikus (emlősökben: Bad, Bak, Bax, Bcl-rambo, Bcl-xS, Bid, Bik, Bim, Blk, BNIP3, Bok/Mtd, Hrk, Nip3) proteinek (Reed, 1998; Slee et al., 1999). A Bax-Bak proteinek eredetileg a citoplazmában lokalizáltak, melyek képesek a mitokondrium külső membránjába transzlokálódni. P38 és C-Jun aktivitás eredményeképpen a pro-apoptotikus Bad triggereli a Bax-Bak

oligomerizációját, melyek fokozzák a mitokondrium permeabilitás tranzíciós pórus áteresztő képességét, ezzel citokróm c molekulákat felszabadítva az intermembrán térből (Sun et al., 1999). A folyamattal párhuzamosan hipokalémia által iniciált C-Jun és p38 mediálja a NADPH-oxidáz működését, amely szuperoxid anion gyökök generálásával intracelluláris stressz folyamatokat indukál (Ramiro-Cortes et al., 2011; Simon et al. 2005), így az endoplazmatikus retikulumot ért stressz felszabadítja kaszpáz-12 enzimet (Fan et al., 2005). Az aktivált kaszpáz-12 kaszkád mechanizmust indukál, mely során aktiválja a pro-kaspáz-9 molekulát, ami működésbe lendíti a kaszpáz-9 enzimet. Ez az enzim viszont működésbe hozza a kaszpáz-3, -6, -7 proteineket, melyek megkezdik a sejtstruktúrák emésztését (Slee et al., 1999).

### 3. Célkitűzés

1. Az extracelluláris ionmilieu-ben bekövetkező hipoionia által indukált regulációs válaszok számos élettani folyamatban igen jelentős homeosztatikus egyensúly eltolódást iniciálnak. Szakirodalmi adatok alapján megállapítható, hogy a megváltozott  $[K^+]$  kritikus szerepet játszik az endokrin rendszerhez kapcsolt patológiás folyamatokban, mint például a krónikus veseelégtelenségben (Musso et al., 2011), valamint a kardiorenális dekompenzációs szindrómában (Ueno et al., 2010). Szakirodalmi adatok szerint hipo- $[K^+]$  a feszültség kapuzott  $K^+$ -csatornák aktiválásával, befolyásolja a sejtek proliferációs aktivitását (Vaur et al., 1998) (például a kis-sejtes tüdő tumorokban /Pancrazio et al., 1993/). Az extracelluláris ionmilieu -mint környezeti feltétel- változtatásával kiváltott hipokalémia és a kapcsolt sejtszintű mechanizmusok vizsgálata során a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:
  - a. A környezeti feltételváltozások tanulmányozásra alkalmas, olyan standardizált *in vitro* modell rendszer kidolgozását tekintettük célunknak, amelyben a PRL és ACTH szekréciójának nyomon követése megvalósítható normál és belső egyensúly eltolásával kiváltott transzformált endokrin funkciók esetében.
  - b. Vizsgálatainkkal tanulmányozni kívántuk továbbá, hogy az egészséges, primer monolayer adenohipofízis sejt kultúrák, hipokalémia által kiváltott sejtszintű alkalmazkodási mintázatait értelmezzük és megismerjük.
  - c. Vizsgálatainkban az extrém alacsonytól az fiziológiai egyensúlyi koncentrációig változó extracelluláris  $K^+$ -milieu változások követését iteráltuk, hogy ez a hatás miképpen befolyásolja az exocitózis mechanizmusát adenohipofízis sejt kultúrákban.
  - d. Kiemelt figyelmet fordítottunk annak tanulmányozására is, hogy a megváltozott szabályozással bíró transzformált sejt populációk válaszmechanismusait miként módosíthatja hipokalémiás extracelluláris környezet. Ezért jelen vizsgálatunkban a PRL hiperszekréciójában

megnyilvánuló, a népesség nagy százalékában megjelenő laktotroph adenomát választottuk kísérleti objektumként.

2. A társadalmak kémiai anyagterhelése a XX. századi kemizációval igen jelentős xenobiális hatást eredményezett, melyek krónikus és akut egészségügyi hatásaival is számolnunk kell. A biológiai rendszerek legmagasabb szintű szerveződése a neuro-endokrino-immuno kommunikációs akkomodáció, melynek belső szervezeti stabilitása a homeosztázis által vezérelt. E magasan strukturált rendszer dinamikus belső alkalmazkodási mintázatait a homeosztatikus diszruptor vegyületek az entrópia növekedés irányába tolják, ezért vizsgálatainkban célul tűztük ki a következők tanulmányozását:
  - a. A legtöbb szakirodalmi adat ( Colborn et al., 1993; Bigsby et al., 1999; Oehlman et al., 2000; De Bleecker et al., 1992) a HD vegyületek toxikus és kontakt hatására hívják fel a figyelmet, noha e lipofil karakterű, stabilis ágensek felhalmozódhatnak az arra alkalmas szövetekben, így indirekt módon, hosszan elhúzódó egyensúlyváltozást indukálhatnak. Ezért célunk volt olyan *in vivo* és *in vitro* standardizált modellrendszer kialakítása, melyben a szubtoxikus koncentrációjú, krónikus CIB expozítor szerepe tanulmányozható.
  - b. Jelen munkában kiemelt figyelmet fordítottunk a neuroendokrin szabályozásban kulcsszerepet játszó ACTH release mechanizmusának HD vegyületek hatására bekövetkező modulációjára.
  - c. A HD vegyületek által befolyásolt sejtszintű, diszkrét energiatranszfer változások nyomon követésére a  $Mg^{2+}$ -dependens ATPáz aktivitás módosulások tanulmányozását is célunknak tekintettük.
  - d. További célunk volt annak a kérdésnek a vizsgálata is, hogy a szubtoxikus koncentrációjú kombinált CIB kezelés milyen strukturális morfológiai és biokémiai detektálható változásokat indukál az adenohipofízis szöveti morfológiájában.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1 Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez leletezett hím és nőstény (a kísérletek kezdetén 200-250 g súlyú, 4-6 hetes), Wistar törzsű patkányokat használtunk (Charles River, Isaszeg, Magyarország). A kísérleti periódus alatt az állatokat kontrollált körülmények mellett (55-65 %-os relatív páratartalom,  $22 \pm 2$  °C léghőmérséklet), automatizált diurnális környezetben (12 h nappali, 12 h éjszakai megvilágítási ciklusok) 32x40x18 cm méretű ketrecekben tartottuk (ketrecenként 5 állat). A kísérleti állatok számára szükséges táplálék (CRLT/N, Charles River, Magyarország) és ivóvíz *ad libitum* állt rendelkezésre. A standardizált kísérleti protokoll alapján végzett vizsgálatokba bevont állatokat a laboratóriumi állatokra, valamint a kísérleti eljárásokra vonatkozó, 40/2013. (II. 14.) Korm. rendelet az állatkísérletekről, tiszteletben tartása mellett végeztük.

### 4.2 Indukált prolaktinóma és in vitro kísérletek

A megváltozott neuroendokrin rendszer tanulmányozását prolaktinóma modellrendszeren kívántuk megvalósítani. Adenohipofizeális prolaktinóma indukcióhoz nőstény Wistar patkányokat (n=20) 6 hónapon keresztül subcutan kezeltünk öszttron-acetáttal (CAS regisztrációs szám: 901-93-9, Sigma, Németország; 150 µg/ts. kg/hét) (Molnár et al., 2014).

Pentobarbital (4,5 mg/ts. kg, Nembutal, Abott, USA) anesztéziát követően a kezelt és kezeletlen kísérleti állatokat dekapitáltuk, majd az AdH és NH szöveteket preparáló mikroszkóp alatt szeparáltuk. Az AdH szövetekből enzimátikus (trypsin: 0.2 % /Sigma, Németország/ 30 percig; kollagenáz /Sigma, Németország/: 30 µg/ml 40 percig; diszpáz /Sigma, Németország/: 50 µg/ml 40 percig, az oldatok elkészítéséhez foszfát-puffert használtunk /PBS-A/; hőmérséklet: 37°C) és mechanikus (83 és 48 µm pórusátmérőjű neylon-blutex filtert használva) disszociáltatás után primér, monolayer sejtkultúrákat készítettünk.

A sejtek viabilitás ( $\geq 95\%$ , tripán-kék festés alapján) kontrollja után a sejtdenzitást  $2 \times 10^5/\text{ml}$ -re állítottuk be, majd a szuszpendált sejteket mosás után Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM, Sigma, Németország) + 20% Fetal Calf Serum (FCS, Sigma, Németország) + 1.0  $\mu\text{g/ml}$  Penicillin+Streptomycin (Sigma, Németország) tápoldatba, majd 5 % kollagénnel felületkezelt 24 lyukú plasztik tenyésztőedényekbe (Nunc., Németország), és termosztátba helyeztük ( $T = 37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pCO}_2: 5\%$ ). A sejt kultúrákat a letapadást követően 3 naponként friss tápoldattal mostuk, amíg azok konfluenssé váltak. Ezt követően a primér sejt kultúrákat PRL és ACTH tartalomra immunhisztokémiai módszerekkel standardizáltuk.

A funkcionális standardizálást és a bazális ACTH és PRL hormonszint meghatározást Tyrode mediumban (Sigma, Németország) is elvégeztük. Az állandó ionerősségű mediumban a  $[\text{K}^+]$ -t változtattuk a többi esszenciális anion és kation homeosztatis (izoionikus) koncentrációban volt jelen. A primér, monolayer sejt kultúrák hormon elválasztását 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mM  $[\text{K}^+]$  környezetet reprezentáló hipokalémiás közegben vizsgáltuk. A kezelések 10, 20, 30, 60 és 90 perces időpontjaiban mintákat vettünk a felülúszó mediumból, melyeket  $-80^\circ\text{C}$ -on a mérésig tároltuk. Az összegyűjtött mintákból a PRL-t radioimmunoassay (RIA), az ACTH-t immunochemiluminescence assay (LIA) módszerekkel határoztunk meg.

A mintákból a PRL meghatározást dolgozat alapjául szolgáló közleményben leírtak szerint végeztük (Molnár et al., 2014). A PRL RIA érzékenysége 0,07 ng/assay cső volt. Az intra- és interassay variáció  $0,92 \pm 0,03$  ng volt, az adatokat ng PRL/ mg protein-ben adtuk meg.

Az ACTH meghatározása az SZTE ÁOK I. sz. Belgyógyászati Klinika Endokrinológiai Osztály mérőberendezésével (Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostic, Deerfield, IL, USA, és DPC kit /L2KAC-02, Euro DPC Ltd., Glyn Rhonwy, Egyesült Királyság/) történt. Az adatokat pg ACTH/ mg protein dimenziókban adtuk meg.

A minták fehérjetartalmát módosított Lowry-módszerrel (Lowry et al., 1951) és Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) segítségével határoztuk meg.

#### **4.2.1 Apoptózis vizsgálata (immunocitokémia)**

A primer, monolayer sejtkultúrákat a fent leírt protokollnak megfelelően nyertük majd immunfestéshez előkészítettük [5 perc mosás: trisz(hidroximetil)-aminometán (TBS 0,05 M, pH 7,4, 0,85% NaCl) puffer oldatban, majd 5 perc, T=25 °C-on inkubálás: peroxidáz inhibitor reagenssel]. Az immunfestés során a mintákat 60 percig inkubáltuk anti-Bcl-2-vel (Santa Cruz Biotechnology Inc., hígítási arány: 1:25, N-19, sc-492), majd mostuk TBS oldattal, és a megkötött antitesteket 3,3'-diaminobenzidin tetra-hidroklorid (DAB, Sigma, Németország) segítségével tettük láthatóvá. A sejtkultúrák alapos mosása után fázis kontraszt invertoszkópra (Zeiss) helyezett Olympus kamera (Olympus C-7070) felhasználásával vizsgálati objektumokról felvételeket készítettünk.

#### **4.2.2 Statisztikai analízis**

A különböző  $[K^+]$  kezelések normál adenohipofízisre és prolaktinómás adenohipofízisre gyakorolt hatásainak matematikai elemzéséhez ismételt mérések ANOVA módszert használtunk: normál AdH és PRLoma ACTH szekréció, valamint normál AdH és PRLoma PRL release vonatkozásában. A kezelést (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mM  $[K^+]$ ), mint csoportosító változót, az időt (10, 20, 30, 60, 90 perc), mint összetartozó faktorváltozót használtunk. Összehasonlítást végeztünk a kezeletlen, normál AdH, illetve 0 mM  $[K^+]$ -al kezelt PRLoma sejtpopulációk ACTH és PRL release-e között, ehhez ismételt mérések ANOVA-t alkalmaztunk. A statisztikai próbák eredményeként szignifikáns különbséget ( $p < 0,001$ ) találtunk a vizsgált faktoroknál. Amikor a Mauchley teszt szfericitása szignifikáns volt, a Greenhouse-Geisser-féle korrigált értéket vettük figyelembe. A többszemponos variancianálízishez Sidak finombeállítással korrigált csoportátlagokat használtuk.

A statisztikai elemzésekhez IBM SPSS Statistics, version 21 programot használtunk (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Eredményeinket átlag  $\pm$  standard hiba (SEM) formában tüntettük fel. A gráfokat SAS 9.2 software segítségével készítettük (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

### **4.3 Homeosztatisz diszruptor vegyületek tanulmányozására felállított kísérleti protokoll**

#### **4.3.1 *In vivo* vizsgálati protokoll**

Kísérleteinkben a hím Wistar törzsű patkányokat gasztrikus szondán keresztül kezeltük 0,1; 1,0 és 10 µg/ts.kg dózisban hexaklórbenzol és 1,2,4-triklórbenzol (ClB) 1:1 arányú keverékével 1 ml végtérfogatban (ClB szolvenseként 0,015% etanol oldatot használtunk), 30, 60, 90 napos expozíciós időtartamban.

A standardizált kísérletfolyamban a vizsgálati állatok kapcsán felállított kísérleti csoportok:

1. Abszolút kontroll csoport (n=5; szondán keresztül vizet kap)
2. Stressz kontroll csoport (n=5; csak gyomorszondázásban részesül)
3. Pozitív kontroll csoport (n=5, szondán keresztül ClB szolvensét, 0,015%-os etanol oldatot kap)
4. Negatív kontroll csoport (n=5; nem kap kezelést)
5. A kísérleti protokollban leírt alkalmazott dózis alapján: 0,1 µg/ts. kg dózis esetén ClB/0,1 (n=10); 1,0 µg/ts. kg dózis esetén ClB/1,0 (n=10); 10 µg/ts. kg dózis esetén ClB/10 (n=10) csoportok kerültek kialakításra.

Pentobarbital (4,5 mg/ts. kg, Nembutal, Abott, USA) anesztéziát követően a kezelt és kezeletlen kísérleti állatokat dekapitáltuk, majd ezt követően alvadásgátolt és natív vérmintákat gyűjtöttünk, melyből ACTH stresszhormon szintjét határoztuk meg LIA módszerrel. Az ACTH szérumbeli szintjét pg ACTH/ ml szérum dimenzióban adtuk meg.

#### **4.3.2 *In vitro* experimentális protokoll**

Dekapitációt követően a kezelt és kezeletlen patkányok neuro- és adenohipofízisét steril fülke és preparáló mikroszkóp alatt szeparáltuk, majd az AdH-ból a fent leírt módon, az egyes kísérleti időpontokban (30., 60., 90. napon) primér, monolayer sejtkultúrákat készítettünk. A funkcionális standardizálást követően a felülúszó



médiumból meghatároztuk a bazális ACTH szintet LIA módszer segítségével. Az ACTH médiumbeli koncentrációját pg ACTH/ mg protein dimenzióban adtuk meg.

A minták fehérjetartalmát módosított Lowry-módszerrel (Lowry et al., 1951) és Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) segítségével határoztuk meg.

A sejtek diszkrét energiatranszfer-változásainak követésére a  $Mg^{2+}$ -dependens ATPáz vizsgálatát alkalmaztuk módosított Martin és Dotty módszerrel (Martin et al., 1949). Az ATPáz aktivitás kifejezésére kontroll % dimeziót alkalmaztunk.

#### **4.3.3 Adenohipofízis immunhisztokémia**

A kísérleti állatokból származó hipofízis mintákból szeparáltuk az AdH-t és felszálló alkoholsorban dehidratáltuk, 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk, majd paraffin blokkra helyeztük. A paraffinba ágyazott mintákból 3-4  $\mu m$  vastag metszeteket készítettünk, majd kétszer 10 perces xilolos és kétszer 5 perces etanolos áztatással deparaffináltuk. A sorozatmetszeteket hematoxin-eosin (HE) rutinfestéssel kontúrfestettük. ACTH-t expresszáló sejtek kimutatására indirekt immunhisztokémiai módszert használtunk, ehhez a metszeteket nyúl ACTH poliklonális antitestek (hígítási arány: 1:500, Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) segítségével 12 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A megkötött antitesteket 0,04 %-os 4-kloro-1-naftol (Sigma, Hamburg, Németország) és Tris-HCl pufferben oldott 0,001 %-os hidrogén peroxiddal tettük láthatóvá (Sigma, Hamburg, Németország).

#### **4.3.4 Statisztikai analízis**

Ahhoz, hogy a különböző kezelési dózisok (0,1; 1,0 és 10  $\mu g/ts. kg$ ) átlagértékeinek kontroll csoporthoz való viszonyát megállapítsuk az egyes kezelési időtartamokban kétszemponos varianciaanalízist futtattunk le. Jelen vizsgálatban két faktorként a dózist, valamint a kezelési időtartamot vettük alapul.

Mindhárom változó tekintetében (sejtkultúrák által released ACTH, szérum ACTH szint, valamint a  $Mg^{2+}$ -dependens ATPáz aktivitás) a kétszemponos ANOVA

szignifikáns különbséget mutatott a csoport átlagok között összességében ( $p < 0,001$ ). Mivel a két fix faktor (kezelési dózis és időtartam) szignifikáns interakciót mutatott ( $p < 0,001$ ), így ezen két hatás nem különíthető el, csak együttesen értelmezhető.

Szignifikáns interakció esetén lehetőség van az átlagok páronkénti összehasonlítására Sidak módszerével (Estimated Marginal Means). A többszörös összehasonlítás kimutatta, hogy a kezelési időtartam függvényében, az alkalmazott dózisokból képzett csoportok szignifikánsan különböznek a kontroll csoporttól ( $p < 0,001$ ).

A statisztikai elemzésekhez IBM SPSS Statistics, version 21 programot használtunk (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Minden statisztikai vizsgálat többszemponos, továbbá az alkalmazott tesztek szignifikancia szintje  $p < 0,05$  volt. Eredményeinket átlag  $\pm$  standard hiba (means  $\pm$  SEM) formában tüntettük fel.

## 5. Eredmények

### 5.1 Hipokalémia hatásainak detektálása normál és megváltozott endokrin funkciók esetében

Célkitűzéseink szerint az extracelluláris ionmilieu változásával követhető hormon-release karakterisztikákat mutatjuk be. A sejt kultúrák standardizálásával megállapítottuk, hogy az ACTH pozitív sejtek aránya AdH sejt kultúrák esetében 15,81 %, az *in vivo* ösztrolon-acetáttal előkezelt patkányok adenohipofíziséből készített primér, monolayer sejt kultúrákban 18,43 % volt. A PRL pozitív sejtek aránya AdH-ban 24,0 %, PRLoma-ban 52,2 % volt.

Az *in vitro* kísérleti protokoll rendszer vizsgálatával nyert eredményeket, illetve a statisztikai különbségeket a kezeletlen normál AdH és a kezeletlen PRLma kontrollokhoz viszonyítva adtuk meg. A kontroll AdH ( $CA_{AdH}^{ACTH}$ ) és PRLma ( $CPRL_{Loma}^{ACTH}$ ) rendszerek és a kísérleti protokoll alapján kezelt sejt kultúrák ACTH elválasztását a 7. és 8. ábrán tüntettük fel

A kontroll AdH ( $CA_{AdH}^{PRL}$ ) és PRLma ( $CPRL_{Loma}^{PRL}$ ) rendszerek és a kezelt sejt kultúrák PRL elválasztását a 9. és 10. diagramokon tüntettük fel.

A 11. és 12. ábrákon  $CA_{AdH}$  és  $CPRL_{Loma}$  sejt kultúrák PRL és ACTH release-t hasonlítottuk össze a 0 mM  $[K^+]$ -val kezelt sejt kultúrák eredményeivel.

#### 5.1.1 Az indukált prolaktinóma és a normál adenohipofízis sejt kultúrák ACTH elválasztása hipokalémia hatására

A 7. ábrán az ACTH release idő-kinetikai paramétereit mutatjuk be hipokalémia hatására. Látható, hogy a kísérlet 10. 20. és 30. percében kontroll AdH ACTH release-hez viszonyítva ( $996,9 \pm 2,55$ ;  $978,4 \pm 1,23$ ;  $1014,5 \pm 1,89$  pg hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM) a 0 mM  $[K^+]$ -val kezelt csoport hormon szekréciója ( $583,5 \pm 1,86$ ;  $701,4 \pm 1,65$ ;  $738,1 \pm 1,26$  pg hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) jelentősen csökkent. A kísérlet 60., 90. percében szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a kezelt sejt kultúra ACTH elválasztásában ( $1966,4 \pm 1,36$ ;  $2625,7 \pm 0,97$  pg hormon/ mg

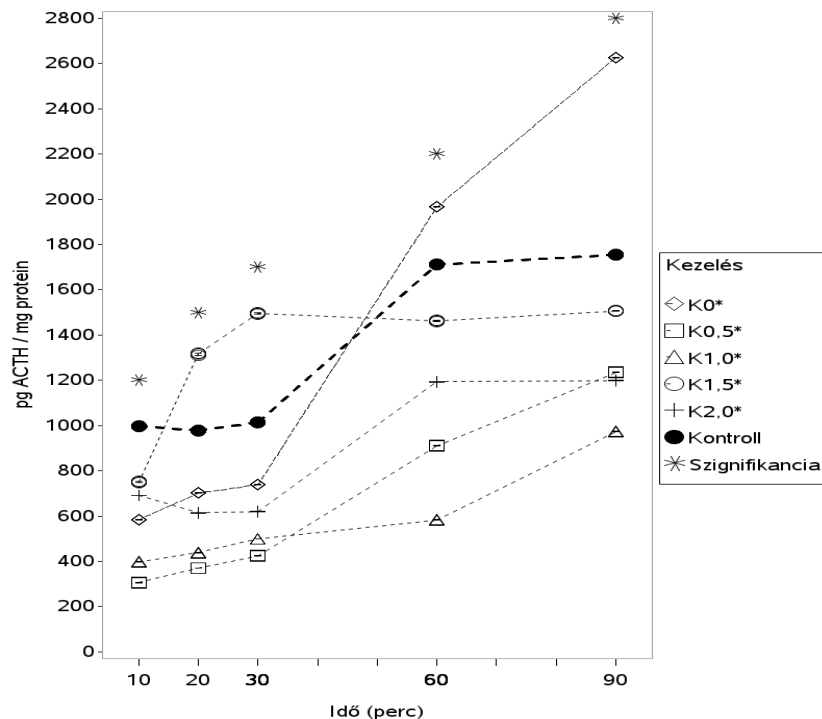
protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) a kontroll csoporthoz viszonyítva ( $1711,3 \pm 2,07$ ;  $1754,5 \pm 1,34$  pg hormon/ mg protein).

A 7. ábra eredményei alapján megállapítható, hogy az AdH sejt kultúrák ACTH elválasztását 0,5 mM-os  $[K^+]$  kezelés az idő függvényében szignifikánsan csökkentette ( $p < 0,001$ ). Jelentős eltérések figyelhetők meg a kontroll csoport hormon elválasztása valamint a kezelt sejt kultúra ACTH szekréciója között ( $306,0 \pm 1,96$ ;  $369,8 \pm 1,26$ ;  $424,6 \pm 1,45$ ;  $911,2 \pm 1,17$ ;  $1235,4 \pm 1,25$  pg hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM).

A kontroll csoport ACTH szintjéhez viszonyítva az 1,0 mM  $[K^+]$ -val kezelt sejt kultúrák hormon elválasztása az idő függvényében szignifikánsan csökkent ( $396,7 \pm 1,82$ ;  $439,3 \pm 1,58$ ;  $499,6 \pm 1,10$ ;  $582,3 \pm 1,75$ ;  $973,5 \pm 1,48$  pg hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ).

A kísérlet 10. percében az 1,5 mM-os  $[K^+]$  az ACTH release-t jelentősen csökkentette ( $750,3 \pm 2,38$  pg hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ). A kísérlet 20. és 30. percében a kezelt AdH sejt kultúra ACTH elválasztása karakterisztikusan emelkedett ( $1315,6 \pm 4,09$ ;  $1494,9 \pm 3,75$  pg hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ), majd a szignifikánsan csökkent a vizsgálat 60. és 90. percében ( $1461,8 \pm 3,61$ ;  $1506,8 \pm 1,48$  pg hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) a kontroll csoporttal összevetve.

A 2,0 mM-os dózis hatására az idő függvényében, az ACTH elválasztás a kontroll csoport eredményeihez viszonyítva szignifikánsan csökkent ( $691,2 \pm 1,58$ ;  $614,4 \pm 1,66$ ;  $618,7 \pm 1,57$ ;  $1192,9 \pm 1,75$ ;  $1199,3 \pm 1,46$  pg hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ).



7. ábra A különböző  $K^+$  koncentrációk hatása az ACTH elválasztásra normál adenohipofízis sejt kultúrákban

Átlag $\pm$ SEM, sejt kultúra kezelések /Tyrode/: 0 mM [ $K^+$ ] ( $K0^*$ ); 0,5 mM [ $K^+$ ] ( $K0,5^*$ ); 1,0 mM [ $K^+$ ] ( $K1,0^*$ ), 1,5 mM [ $K^+$ ] ( $K1,5^*$ ); 2,0 mM [ $K^+$ ] ( $K2,0^*$ ), mintavétel felülúszó médiumból: 10, 20, 30, 60, 90 min, \*:  $p < 0,001$  ANOVA,  $n=10$ .

A 8. ábra adatai alapján megállapítható, hogy a kontroll PRLoma sejt kultúrákhoz képest ( $435,1 \pm 1,39$ ;  $536,3 \pm 3,10$ ;  $713,6 \pm 1,82$ ;  $1887,9 \pm 2,52$ ;  $2083,0 \pm 3,42$  pg hormon/mg protein; means $\pm$ S.E.M.) a 0 mM-os [ $K^+$ ]-val kezelt PRLoma sejt kultúrák ACTH elválasztása ( $813,4 \pm 1,19$ ;  $951,9 \pm 3,03$ ;  $992,6 \pm 1,92$ ;  $1610,5 \pm 1,91$ ;  $4746,2 \pm 3,61$  pg hormon/mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) az idő függvényében szignifikánsan emelkedett.

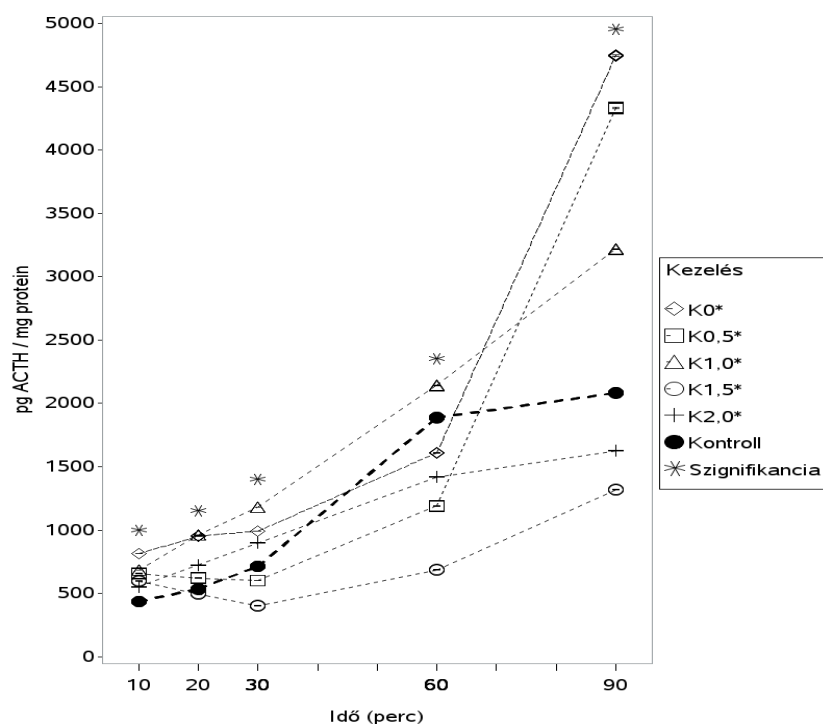
Megállapítható, hogy 0,5 mM-os  $K^+$  expozíció során a kísérlet 10. és 20. percében a kontroll csoporthoz képest az ACTH release a kezelt PRLoma sejt kultúrákban emelkedett tendenciát mutatott ( $655,8 \pm 2,63$ ;  $621,4 \pm 1,84$  pg hormon/mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ). Az ACTH szekréció kinetikája a kezelt sejt kultúrákban a 30. és 60. percen csökkent ( $601,7 \pm 1,39$ ;  $1191,3 \pm 1,53$  pg hormon/mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ). A 90. percen az ACTH elválasztás karakterisztikus növekedését

detektáltuk ( $4333,7 \pm 5,37$  pg hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) a kontroll csoporthoz viszonyítva.

Az 1,0 mM-os dózisú  $K^+$  kezelés hatására az idő függvényében, a PRLma sejt kultúrák hormon elválasztása szignifikáns mértékben emelkedett ( $685,4 \pm 1,53$ ;  $962,0 \pm 2,05$ ;  $1181,3 \pm 1,83$ ;  $2142,0 \pm 1,72$ ;  $3217,7 \pm 2,54$  pg hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) a kontroll PRLma sejt kultúrákhoz viszonyítva.

A 8. ábrán látható, hogy a kísérlet 10. percében az 1,5 mM-os  $[K^+]$  kezelés eredményeként a szekretált ACTH szintje jelentősen emelkedett ( $596,5 \pm 2,56$  pg hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ). Majd az idő függvényében a hormon elválasztás szignifikáns csökkenését detektáltuk ( $495,6 \pm 2,71$ ;  $403,1 \pm 2,18$ ;  $685,0 \pm 2,68$ ;  $1319,7 \pm 2,25$  pg hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) a kontroll csoport adataihoz viszonyítva.

A 2,0 mM-os  $[K^+]$  kezelés hatására a sejt kultúrák ACTH release-e a 10., 20., és 30. percben jelentősen emelkedett ( $552,0 \pm 2,59$ ;  $723,1 \pm 2,88$ ;  $898,4 \pm 2,34$  pg hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) a kontroll csoporthoz viszonyítva. A kísérlet 60., 90. percében a kezelt sejt kultúrák hormon szintje szignifikánsan csökkent ( $1418,9 \pm 2,13$ ;  $1626,1 \pm 2,24$  pg hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ).



8. ábra Extracelluláris  $K^+$  kezelések és az ACTH release prolaktinóma sejt kultúrákban

Átlag $\pm$ SEM, sejt kultúra kezelések /Tyrode/: 0 mM [ $K^+$ ] ( $K0^*$ ); 0,5 mM [ $K^+$ ] ( $K0,5^*$ ); 1,0 mM [ $K^+$ ] ( $K1,0^*$ ), 1,5 mM [ $K^+$ ] ( $K1,5^*$ ); 2,0 mM [ $K^+$ ] ( $K2,0^*$ ), mintavétel felülúszó médiumból: 10, 20, 30, 60, 90 min, \*:  $p < 0,001$  ANOVA,  $n=10$ .

### 5.1.2 A különböző [ $K^+$ ] kezelések hatása a PRL release kinetikájára normál és prolaktinómás adenohipofízis esetében

A 9. ábra alapján a normál AdH 0 mM [ $K^+$ ]-val kezelt csoportjainak PRL szintje csökkent a 10., 20., 30. és 60. percben ( $2,11 \pm 0,01$ ;  $7,65 \pm 0,01$ ;  $7,95 \pm 0,01$ ;  $10,61 \pm 0,02$  ng PRL/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) a kontroll AdH sejt kultúrához viszonyítva ( $7,24 \pm 0,01$ ;  $10,15 \pm 0,01$ ;  $13,18 \pm 0,02$ ;  $17,84 \pm 0,02$  ng PRL/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ). Ezzel szemben a 90. percben a kezelt sejt kultúra hormonszintje karakterisztikusan ( $60,04 \pm 0,02$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) emelkedett a kontroll csoporthoz képest ( $19,93 \pm 0,01$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM).

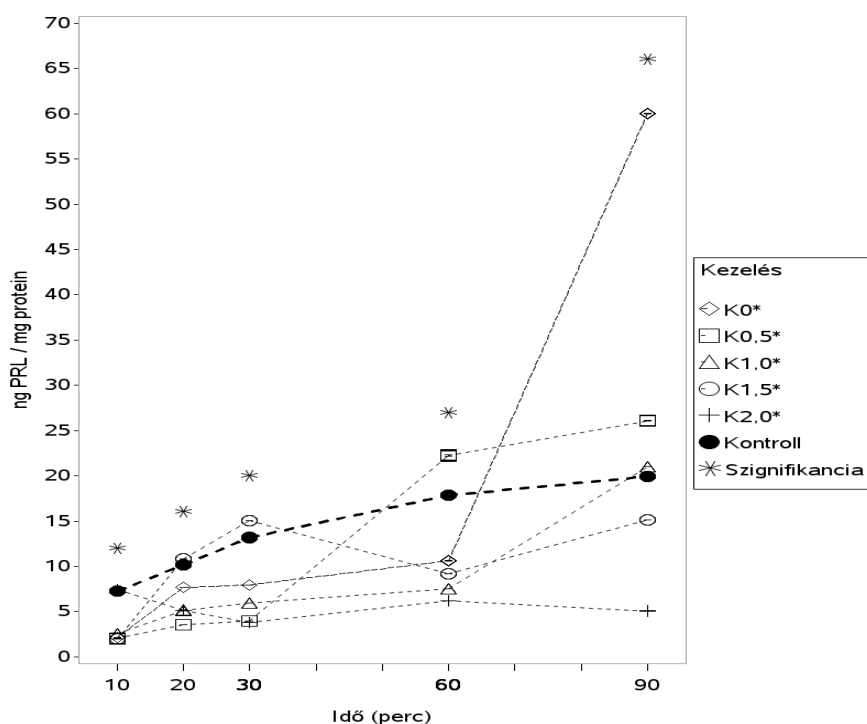
A 0,5 mM-os  $[K^+]$  kezelés eredményeként az AdH sejtkultúrák PRL szekréciója jelentősen csökkent a kísérleti protokoll 30. percéig ( $2,01 \pm 0,01$ ;  $3,56 \pm 0,01$ ,  $3,94 \pm 0,01$  ng hormon /mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ). A 60. és a 90. percben a monolayer sejtkultúrák hormon elválasztása szignifikánsan emelkedett ( $22,25 \pm 0,05$ ;  $26,09 \pm 0,02$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) a kontroll csoporttal összehasonlítva.

Az 1,0 mM-os  $[K^+]$  kezelés eredményeként a 10., 20., 30., 60. percben a PRL release szignifikánsan csökkent ( $2,52 \pm 0,01$ ;  $5,15 \pm 0,01$ ;  $5,93 \pm 0,02$ ;  $7,53 \pm 0,02$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ), ezzel szemben a 90. percben a kontroll csoporthoz viszonyítva jelentősen emelkedett ( $21,0 \pm 0,02$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ).

A 9. grafikon adatai alapján a kísérlet 10. percében az 1,5 mM-os  $[K^+]$  kezelés hatására a szekretált PRL szintje szignifikánsan csökkent ( $1,97 \pm 0,01$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ). A 20., 30. percben a hormon elválasztás jelentős fokozódása volt megfigyelhető ( $10,84 \pm 0,01$ ;  $15,02 \pm 0,01$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) a kontroll csoporthoz viszonyítva. A kísérlet 60., 90. percében a PRL release szignifikáns csökkenése ( $9,14 \pm 0,01$ ;  $15,14 \pm 0,01$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) volt tapasztalható.

Megállapítható, hogy a 2,0 mM-os  $[K^+]$  kezelés a PRL szekréciót a 10. percben csak kis mértékben módosította ( $7,41 \pm 0,01$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM), majd az idő függvényében szignifikáns csökkenés volt tapasztalható ( $5,11 \pm 0,01$ ;  $3,77 \pm 0,01$ ;  $6,13 \pm 0,01$ ;  $5,07 \pm 0,01$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) a kontroll csoporthoz viszonyítva.





9. ábra Extracelluláris  $K^+$  hatása a PRL elválasztásra normál, primer adenohipofízis sejt kultúrákban

Átlag $\pm$ SEM, sejt kultúra kezelések /Tyrode/: 0 mM [ $K^+$ ] ( $K0^*$ ); 0,5 mM [ $K^+$ ] ( $K0,5^*$ ); 1,0 mM [ $K^+$ ] ( $K1,0^*$ ), 1,5 mM [ $K^+$ ] ( $K1,5^*$ ); 2,0 mM [ $K^+$ ] ( $K2,0^*$ ), mintavétel felülúszó médiumból: 10, 20, 30, 60, 90 min, \*:  $p < 0,001$  ANOVA,  $n=10$ .

A 10. ábrán a kontroll PRLoma sejt kultúrák és a kezelt sejt kultúrák PRL elválasztását tüntettük fel hipokalémia hatására. A kontroll csoport adataival összehasonlítva ( $3,86 \pm 0,01$ ;  $7,11 \pm 0,02$ ;  $11,52 \pm 0,01$ ;  $29,72 \pm 0,07$ ;  $48,78 \pm 0,02$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM) a kísérlet 10., 20. és 30. percében a hormon szint emelkedését figyeltük meg ( $7,64 \pm 0,01$ ;  $10,48 \pm 0,02$ ;  $15,32 \pm 0,05$  hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM). A 60. percben a hormon release diszkrét emelkedését detektáltuk ( $29,12 \pm 0,02$  ng hormon/mg protein, means  $\pm$  SEM). A kísérlet végpontjában szignifikáns PRL szint emelkedést tapasztaltunk ( $89,23 \pm 0,17$ , ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ).

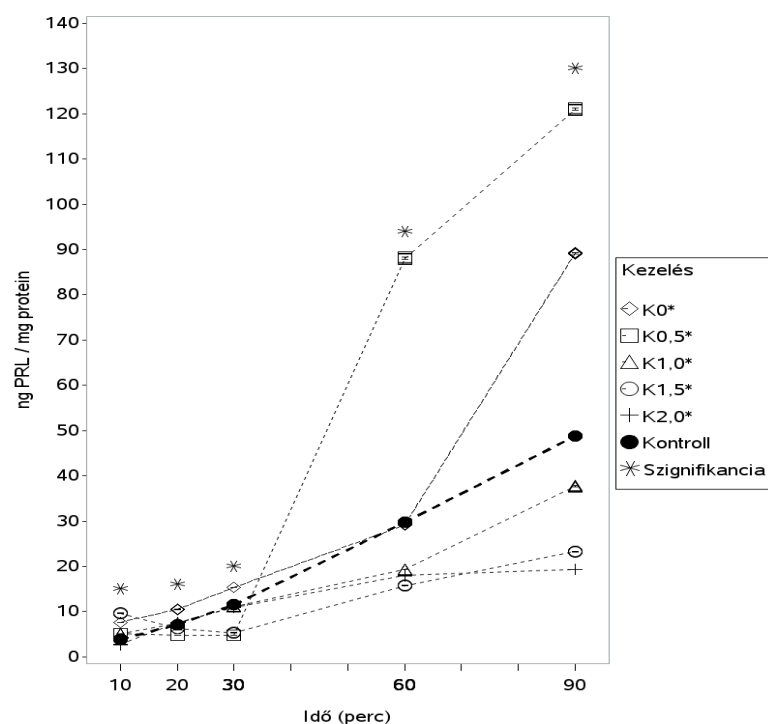
0,5 mM-os  $K^+$  expozíció során a vizsgálat 10. percében a PRL szint emelkedése ( $5,11 \pm 0,02$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM) volt megfigyelhető. A 20. és a 30. percben a PRL szekréció jelentősen csökkent ( $4,82 \pm 0,02$ ;  $4,73 \pm 0,02$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) a kontroll csoporttal összevetve. A kísérlet 60. és 90. percében

a PRL szint szignifikáns emelkedése ( $88,07 \pm 0,25$ ,  $121,0 \pm 0,25$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) volt megfigyelhető.

Az 1,0 mM-os  $K^+$  kezelés során megállapítható, hogy a PRLma sejt kultúrákban a 10., 20. és 30. percben a hormon szekréció szignifikáns emelkedése ( $5,11 \pm 0,02$ ;  $7,39 \pm 0,02$ ,  $11,13 \pm 0,04$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) volt tapasztalható. A primer PRLma sejt kultúrák PRL szekréciója szignifikánsan csökkent ( $19,34 \pm 0,02$ ;  $37,67 \pm 0,21$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) a kezelés 60. és 90. percében a kontroll csoport eredményeivel összehasonlítva.

1,5 mM-os  $[K^+]$  kezelés során a PRLma sejt kultúrák hormon elválasztása a 10. percben emelkedett ( $9,63 \pm 0,02$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) a kísérleti protokoll kardinális pontjaiban vett minták esetében azonban szignifikánsan csökkent ( $6,28 \pm 0,04$ ;  $5,32 \pm 0,03$ ;  $15,77 \pm 0,02$ ;  $23,24 \pm 0,07$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) a kontroll csoporthoz viszonyítva.

Megállapítható, hogy 2,0 mM-os  $[K^+]$  kezelés hatására a hormon szekréció csökkent ( $2,7 \pm 0,02$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) kísérlet 10. percében. A 20. percben a PRL szint diszkrét emelkedése ( $7,61 \pm 0,04$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) volt megállapítható a kontroll csoporthoz viszonyítva. A kísérleti protokoll kardinális pontjaiban vett minták PRL szintje szignifikánsan csökkent ( $10,94 \pm 0,03$ ;  $17,93 \pm 0,03$ ;  $19,29 \pm 0,03$  ng hormon/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) a kontroll csoport értékeihez viszonyítva.

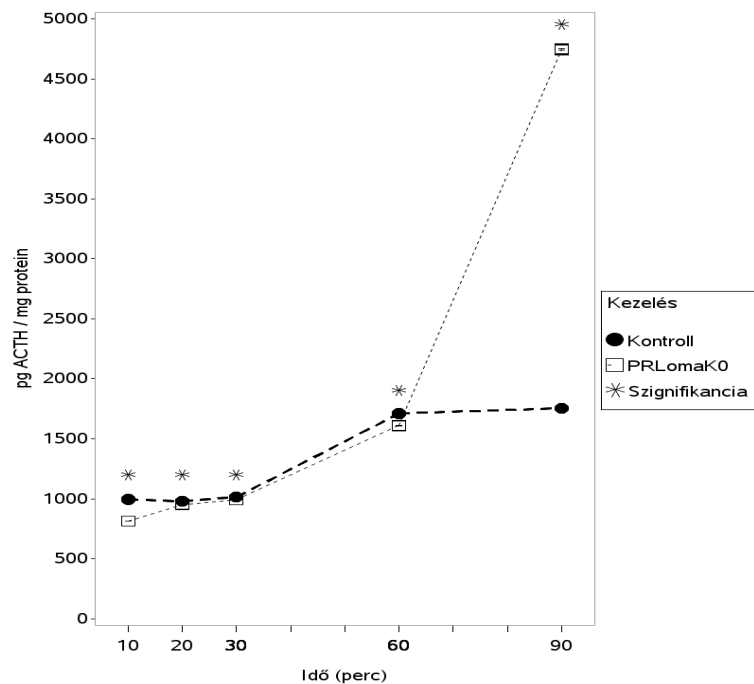


10. ábra Extracelluláris  $K^+$  koncentrációk változása és a PRL release primer prolaktinóma sejt kultúrákban

Átlag $\pm$ SEM, sejt kultúra kezelések /Tyrode/: 0 mM [ $K^+$ ] ( $K0^*$ ); 0,5 mM [ $K^+$ ] ( $K0,5^*$ ); 1,0 mM [ $K^+$ ] ( $K1,0^*$ ), 1,5 mM [ $K^+$ ] ( $K1,5^*$ ); 2,0 mM [ $K^+$ ] ( $K2,0^*$ ), mintavétel felülúszó médiumból: 10, 20, 30, 60, 90 min, \*:  $p < 0,001$  ANOVA,  $n=10$ .

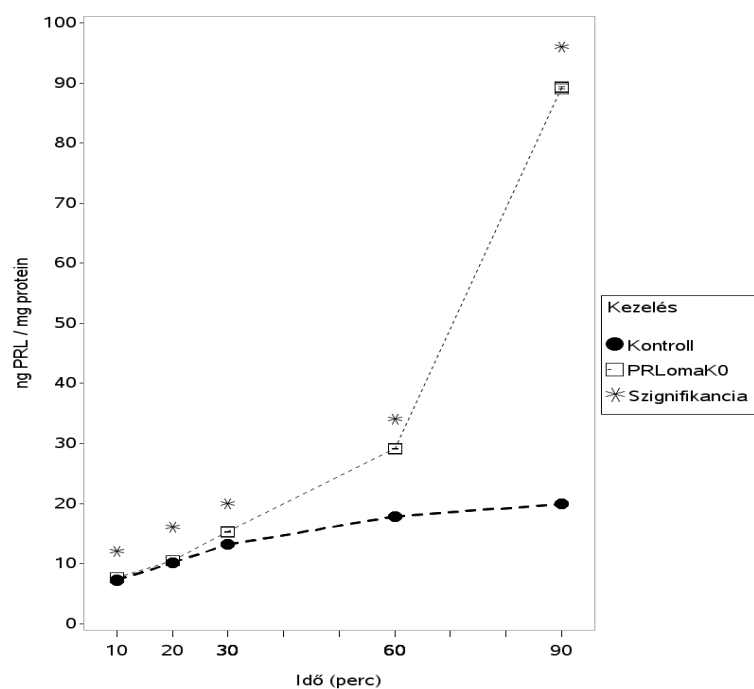
### 5.1.3 Normál adenohipofízis és 0 mM-os [ $K^+$ ]-val kezelt prolaktinómás adenohipofízis ACTH és PRL szekréciója

A következőkben a normál adenohipofízis, valamint a hipokalémia által módosított, megváltozott endokrin regulációt mutatjuk be PRLoma sejt populációkon, azaz két különböző rendszer elválasztási kinetikáját vetjük össze. Mindezt tettük azért, mert a terápiás gyakorlatban az egészséges rendszerállapot jellemzőinek és a megváltozott rendszerállapot paramétereinek összehasonlítása valósul meg. A 11. ábrán látható, hogy a kísérlet 90. percében az ACTH elválasztása jelentősen fokozódott PRLoma kultúrákban. Hasonló interakció figyelhető meg a 12. ábrán is: a felülúszó médium emelkedett hormonszintet mutat a kezeletlen csoporttal összehasonlítva.



11. ábra Normál adenohipofízis és 0 mM-os  $[K^+]$ -val kezelt prolaktinómás sejtkultúrák ACTH elválasztása

Átlag $\pm$ SEM, mintavétel felülúszó médiumból: 10, 20, 30, 60, 90 min, \*:  $p < 0,001$  ANOVA,  $n=10$ .

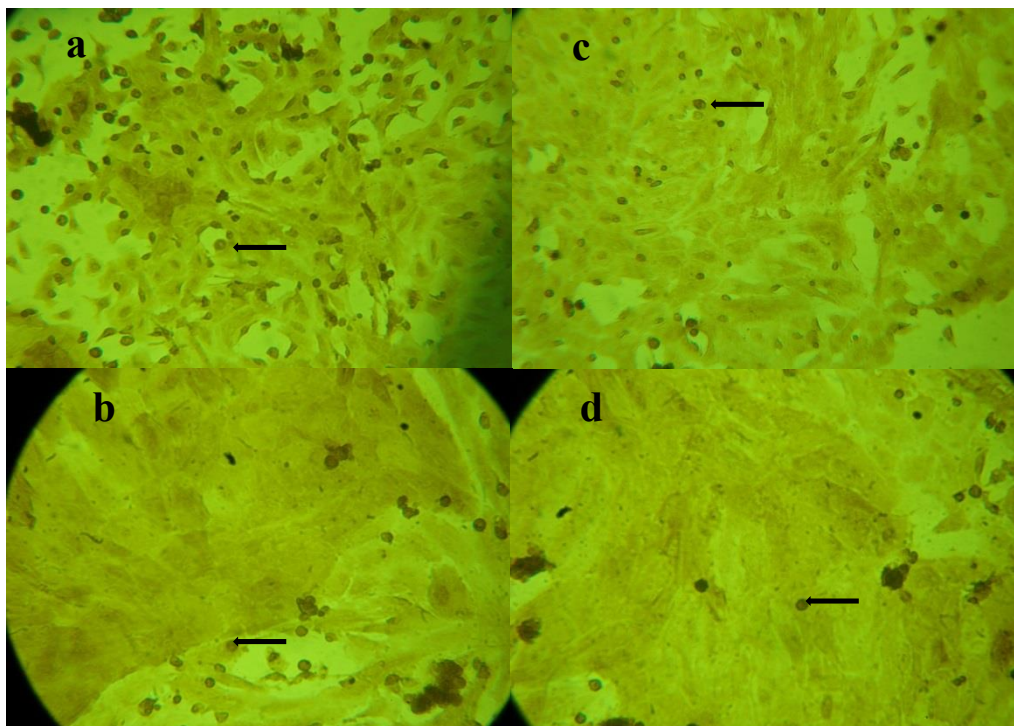


12. ábra Normál adenohipofízis és 0 mM-os  $[K^+]$ -val kezelt prolaktinómás sejtkultúrák PRL elválasztása

Átlag $\pm$ SEM, mintavétel felülúszó médiumból: 10, 20, 30, 60, 90 min, \*:  $p < 0,001$  ANOVA,  $n=10$ .

#### 5.1.4 Immunofestés

A Bcl-2 molekulák az apoptózis kulcs reguláló fehérjéiként ismertek. Az *in vitro* kísérleti protokollunkban a sejt túlélésének követésére membrán asszociált onkoproteinek vizsgálatát alkalmaztuk az apoptózis igazolására. A 13. ábrán jól látható, hogy az AdH monolayer sejtkultúrák Bcl-2 proteinre pozitív citoplazmatikus immunreakciót produkáltak. Anti-Bcl-2-vel történt immunocitokémiai festést követően megállapítható, hogy a 0 mM  $[K^+]$ -val kezelt primér sejtkultúrákban a Bcl-2 protein szintje alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz viszonyítva.



13. ábra Bcl-2 protein immunocitokémiai vizsgálata patkány adenohipofízis monolayer sejtkultúrákban

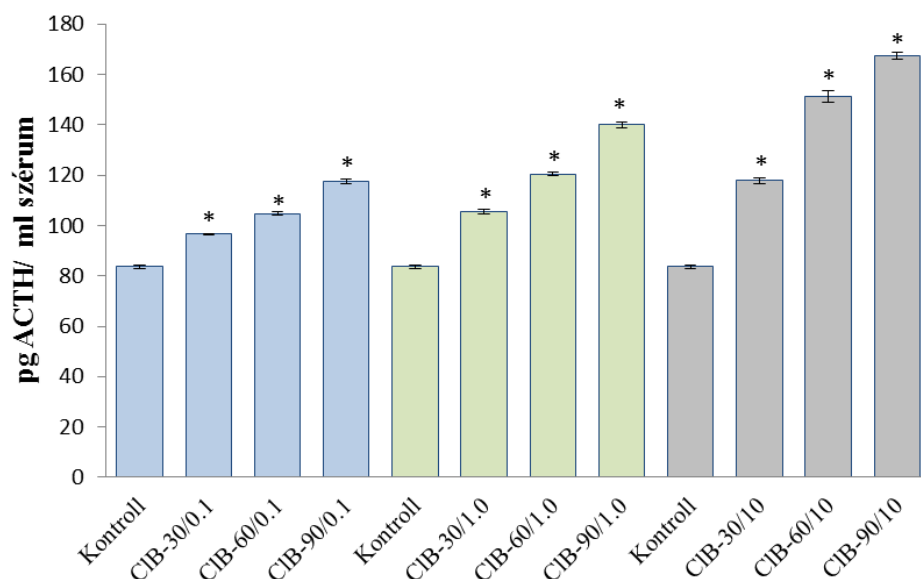
A sejteket antiszérium specifikus Bcl-2-vel festettük, az antitesteteket DAB festési módszerrel tettük láthatóvá. a, b: kontroll, primér sejtkultúrák, c, d: primér, monolayer sejtkultúrák hipokalémia hatására, nyíllal indikáltuk a Bcl-2 expressziós helyeket. (a-d: 40x)

## 5.2 Kombinált klórbenzol expozíciók hatásainak vizsgálati eredményei

Célkitűzéseink második fő tématerületeiben a kémiai környezetterhelő ágensek hatásaira bekövetkező diszkrét egyensúlyeltolódások vizsgálatát kívántuk tanulmányozni. A feltüntetett *in vivo* és *in vitro* vizsgálati paramétereinkben nem tapasztaltunk szignifikáns különbségeket az egyes kontroll szerinti eredmények között. Nem mutatott szignifikáns eltérést az abszolút kontrollként kezelt állatcsoport eredményeitől a stresszkontroll, a pozitív kontroll és a negatív kontroll csoportként kezelt állatok szérum, valamint az *in vitro* vizsgált sejtkultúrák hormontartalmának,  $Mg^{2+}$ -dependens ATPáz enzim aktivitás paraméterei. Ezért az eredmények prezentálásakor a 14.-17. számú eredményábrákon csak az abszolút kontroll állatokból származó paraméterértékeket tüntettük fel.

### 5.2.1 Szérum ACTH hormon értékek

Az 14. eredményábrán a kezeletlen abszolút kontroll csoportok eredményeit hasonlítottuk össze a 0,1; 1,0 és 10,0  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$  dózisban alkalmazott (0, 30, 60, 90 nap) CIB expozíciókkal szemben. A 0,1  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$  dózisú CIB mix kezelés eredményeképpen a szérum ACTH szint jelentősen emelkedett ( $96,55 \pm 0,37$ ;  $104,69 \pm 0,75$ ;  $117,47 \pm 0,87$  pg ACTH/ ml szérum, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ) a kontroll csoporttal összehasonlítva ( $83,57 \pm 0,59$  pg ACTH/ml szérum, means  $\pm$  SEM). A szérum hormonszintje szignifikánsan emelkedett 1,0  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$  dózisú CIB expozíciók eredményeképpen ( $105,46 \pm 0,85$ ;  $120,46 \pm 0,73$ ;  $139,94 \pm 1,06$  pg ACTH/ ml szérum, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ). Ugyancsak jelentős eltérést detektáltunk a 10,0  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$  dózisban alkalmazott HD vegyületek expozíciója után ( $117,91 \pm 1,14$ ;  $151,23 \pm 2,36$ ;  $167,44 \pm 1,38$  pg ACTH/ ml szérum, means  $\pm$  SEM).



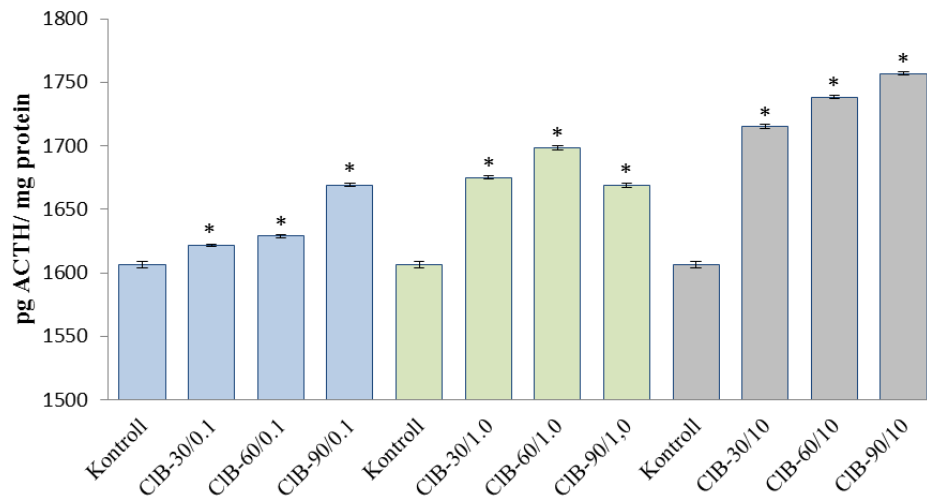
14. ábra Szérumban mért ACTH koncentráció értékek

Átlag $\pm$ SEM, n=10/kísérleti csoport, \*:  $p < 0,001$ , szignifikancia értékeket ANOVA módszerrel határoztuk meg, az adatokat a kontrollok, valamint a 30, 60, és 90 napos, 0,1  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$ , és 1,0  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$  és 10,0  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$  dózisú kombinált klórbenzol expozíciós kezelési minták vonatkozásában tüntettük fel.

### 5.2.2 Adenohipofízis sejtkultúrák hormon szekréciója

A 4.3.2 fejezetben leírt kísérleti protokoll szerinti kezelésben az AdH sejtkultúrák felülúszó médiumait összegyűjtöttük és LIA módszerrel meghatároztuk a released ACTH koncentrációkat. Eredményeinket az 15. ábrán tüntettük fel.

Az AdH sejtkultúrák bazális ACTH ( $1606,5 \pm 2,32$  pg ACTH/ mg protein, means  $\pm$  SEM) szekrécióját az alkalmazott szubtoxikus CIB expozíciók jelentősen módosították. A felülúszó médium hormonszintje szignifikánsan emelkedett 0,1  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$  dózisú CIB mix kezelés hatására ( $1621,7 \pm 1,01$ ;  $1628,8 \pm 0,93$ ;  $1669,2 \pm 1,05$  pg ACTH/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ). Jelentős eltéréseket figyeltünk meg a kontroll állatokból nyert AdH sejtkultúrák ACTH elválasztása és az 1,0  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$  dózisú CIB kezelések által mediált hormonszekréció között ( $1675,2 \pm 1,60$ ;  $1698,3 \pm 1,80$ ;  $1669,2 \pm 1,67$  pg ACTH/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ). A 10  $\mu\text{g}/\text{ts.kg}$  dózisú CIB kezelés szignifikánsan emelkedő tendenciájú hormon release-t indukált a vizsgált kezelési csoportban ( $1715,3 \pm 1,48$ ;  $1738,4 \pm 1,15$ ;  $1756,8 \pm 1,19$  pg ACTH/ mg protein, means  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ ).

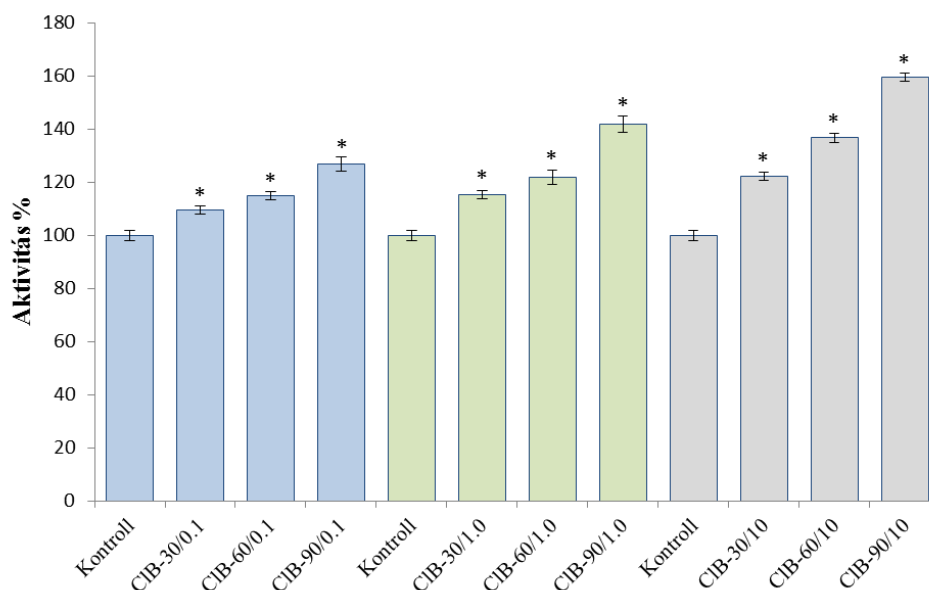


15. ábra Primér, monolayer adenohipofízis sejtültúrák által released ACTH szintek  
 Átlag±SEM, n=10/kísérleti csoport, \*:  $p < 0,001$ , szignifikancia értékeket ANOVA módszerrel határoztuk meg, az adatokat a kontrollok, valamint a 30, 60, és 90 napos, 0,1 µg/ts.kg, és 1,0 µg/ts.kg és 10,0 µg/ts.kg dózisú kombinált klórbenzol expozíciós kezelési minták vonatkozásában tüntettük fel.

### 5.2.3 $Mg^{2+}$ -dependens ATPáz aktivitásának változása

A sejtek diszkrét energiatranszferének követésére a  $Mg^{2+}$ -dependens ATPáz aktivitást vizsgáltuk. A kezeletlen kontroll csoport aktivitásával (100 %) összehasonlítva a 0,1 µg/ts.kg dózisú HD kezelés az energiatranszfert szignifikánsan növelte ( $109,5 \pm 1,55$ ;  $114,9 \pm 1,59$ ;  $126,9 \pm 2,66$  %, means ± SEM,  $p < 0,001$ ). 1,0 µg/ts.kg dózisú ClB mix kezelés hatására az idő függvényében a  $Mg^{2+}$ -dependens ATPáz aktivitása szignifikánsan fokozódott ( $115,3 \pm 1,55$ ;  $121,9 \pm 2,63$ ;  $141,9 \pm 3,09$  %, means ± SEM,  $p < 0,001$ ) a kontroll csoport eredményeivel összehasonlítva. Az enzimaktivitás karakterisztikus emelkedését ( $122,2 \pm 1,66$ ;  $136,6 \pm 1,66$ ;  $159,4 \pm 1,51$  %, means ± SEM,  $p < 0,001$ ) detektáltuk a legnagyobb alkalmazott dózisú kezelés eredményeképpen.



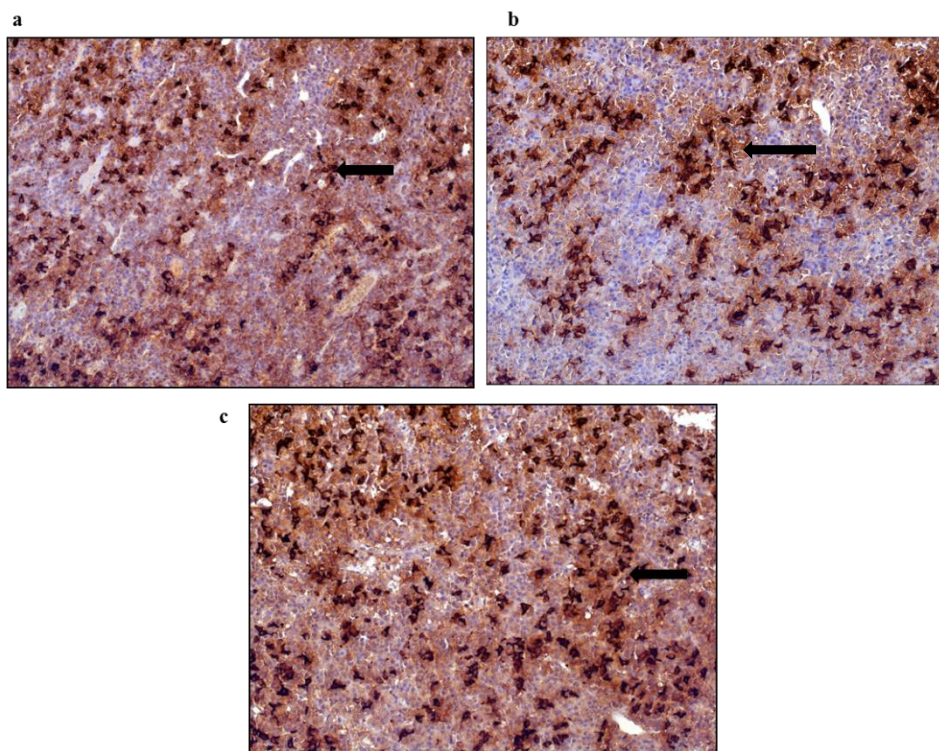


16. ábra A  $Mg^{2+}$ -dependens ATPáz aktivitás változásai szubtoxikus klórbenzol expozíciók hatására

Átlag±SEM, n=10/kísérleti csoport, \*:  $p < 0,001$ , szignifikancia értékeket ANOVA módszerrel határoztuk meg, az adatokat a kontrollok, valamint a 30, 60, és 90 napos, 0,1  $\mu g/ts.kg$ , és 1,0  $\mu g/ts.kg$  és 10,0  $\mu g/ts.kg$  dózisú kombinált klórbenzol expozíciós kezelési minták vonatkozásában tüntettük fel.

#### 5.2.4 Adenohipofízis immunhisztokémiai vizsgálatok

A kezelt és kezeletlen AdH blokkból elvégzett ACTH immunhisztokémiai reakció pozitív eredményt mutatott (17. ábra). Az 17.c ábrán jól megfigyelhető, hogy a 10  $\mu g/ts.kg$  dózisú kombinált CIB expozíciós kezelés után, az ACTH specifikus immunreakció eredményeképpen, lényegesen intenzívebb exocitotikus aktivitást mutató ACTH immunpozitivitás, a kezeletlen, kontroll csoporttal szemben. Az alacsonyabb dózisú CIB mix kezelés eredményeképpen az ACTH produkció diszkrét változásai figyelhetőek meg.



17. ábra Az ACTH expresszió immunhisztokémiai analízise patkány adenohipofízisben  
a: ACTH expresszió kontroll, kezeletlen patkány adenohipofízisben. b: ACTH pozitív sejtek 1,0 µg/ts.kg  
dózisú kombinált klórbenzol expozíció esetében. c: ACTH pozitív sejtek patkány adenohipofízis  
szövetben 10 µg/ts.kg dózisú kombinált klórbenzol expozíciós kezelés eredményeképpen. ACTH  
szekréciós helyeket nyíllal jelöltük. (a-c: 20x)

## 6. Megbeszélés, következtetések

Jelen munkában a biológiai rendszerek (normál és transzformált sejt, organizmus) és a működésüket meghatározó környezetüket vizsgáltuk. Ebben a vonatkozásban az extracelluláris ionmilieu meghatározó külső feltétel, amelynek tanulmányozásához *in vitro* modell rendszereket, nevezetesen primér monolayer adenohipofízis sejt kultúrákat használtunk, melyek sejtszintű folyamatait standardizáltuk. Jelen vizsgálatainkban az ACTH és PRL szekréciójának kinetikáját hipokalémiás körülmények között monitoroztuk, egészséges és lokális környezeti extracelluláris egyensúly eltolással megváltoztatott endokrin funkciók esetében. A modellezett extracelluláris hatások jól követhetőek voltak hormon exocitózis változásokkal, intracelluláris receptor és/vagy messenger molekulák diszkrét modulációjával. Eredményeinkből megállapíthatjuk, hogy amint a sejt új trajektóriába (egymás utáni állapotok sorozata) kerül, ahhoz szükségképpen alkalmazkodnia kell (Sherr et al., 1995; Cooper 1998). A célkitűzésünkben vázolt környezeti hatások objektív detektálásának érdekében modellrendszereket fejlesztettünk HD vegyületek biológiai hatásainak követésére is.

A rendszer alkalmazkodása olyan folyamatkaszkádnak, amelyben az adott biológiai objektum információkat „szerez” a környezetéről, és ahhoz saját strukturális és funkcionális adottságaival iterál. Irodalmi adatok szerint a HD vegyületek ösztrogénmimikus tulajdonságokkal is rendelkeznek, így számos endokrin funkciójú szövet aktivitását modulálni képesek. A laktotrop adenomák karakterisztikusan a PRL hiperszekréciójában nyilvánulnak meg (Spada, 1998.; Karaca et al., 2010), kialakulásukban a környezeti stimulusok esszenciális szerepet játszanak (pl. antikonciptív szerek, ösztrogének). Eredményeinkből jól látható, hogy  $K^+$  megvonás következtében a PRLoma sejt kultúrák hormon szekréciója a kísérleti periódus kezdetén a kezeletlen, normál AdH sejt kultúrák hormonszekréciójához közelített, majd a felülúszó mediumban karakterisztikusan emelkedett hormonszinteket detektáltunk (11.-12. ábra). Amikor a kialakított modellrendszereket külön vizsgáltuk az alkalmazott 0 és 0,5 mM-os  $[K^+]$  expozíció eredményeként a médium hormontartalmának jelentős emelkedését detektáltuk az egyes kontrollcsoportokkal összehasonlítva. Ebben a folyamatban irodalmi adatok szerint (Kiess et al., 1998.; Tejada et al., 2002) a sejttöregedés kaskádmechanizmusai játszhatnak kulcsszerepet. Számos extracelluláris stimulus, pl. hipokalémia intracelluláris tirozin kinázokat aktivál, melyek mediálják

többek között a MAPK proteineket, így a foszforilációval kiváltott kaszkád reakciósor eredményeképpen sejt halált indukálnak (Ghobrial et al., 2005). Az apoptózis belső szabályozó mechanizmusai kritikusak a sejtciklus, és a sejtproliferáció kontrolljában. Irodalmi adatok alátámasztják azt a tényt, hogy hipotónia által kiváltott apoptotikus folyamatokban elsősorban a p38 protein, a stressz kináz JNK, valamint ASK1 proteinek játszanak lényeges szerepet (Ramiro-Cortes et al., 2011). Hipokalémia által indukált ASK1 triggereli a JNK és p38 aktiválódását. E sejtszintű mechanizmusok megindítják a Bcl-2 molekula család pro-apoptotikus proteinjeinek foszforilációját. Az aktivált Bad triggereli a Bax-Bak oligomerizációját, mely az apoptózis iniciációjához vezet, ezzel párhuzamosan az anti-apoptotikus Bcl-2 protein szintje jelentősen csökken (Verma et al. 2011), melyek eredményeinkben is jól tükröződnek. A megfigyelt PRL és ACTH elválasztási kinetikák szignifikáns emelkedéseinek lehetséges magyarázata a membrán dezintegrációjához kapcsolható. Az alkalmazott expozícióhoz köthetően a kaszpáz-12 enzim megkezd a sejt strukturális elemeinek lebontását, ezzel párhuzamosan zajlik a hormon tartalmú vezikulák emésztése is (Fan et al., 2005; Slee E. A. et al. 1999). PRLoma-s AdH sejt kultúrák ACTH elválasztása összefüggésbe hozható a kísérleti protokollban bemutatott *in vivo* kezeléssel is. Szakirodalmi adatok alátámasztják, hogy ovarium eredetű szteroid hormonok, különösképpen az ösztrogének indirekt módon modulálják a hipotalamo-hipofízis-mellékvese axis aktivitását is (Visser-Wisselaar et al., 1997; Xu et al., 2000). Az ösztrogének fokozzák a kortikotrop-releasing hormon expresszióját, mely megemeli a kortikotrop sejtek proliferációs tevékenységét (Roy et al., 1999), így a magasabb proliferációs ráta magasabb ACTH elválasztást eredményez. Az ACTH, mint stresszhormon esszenciális szerepet tölt be kémiai stresszorokkal szembeni válaszmekanizmusok kiváltásában. Jelen összefüggésben a hipokalémia kémiai stresszorként értelmezhető. A végdifferenciált sejt funkcióban a fokozódó ACTH release következtében a kortikotrop sejtek az ion-egyensúly eltolását homeosztatikus közeli állapotra igyekeztek módosítani (7.-8. ábra). Dolgozatban bemutatásra kerülő HD vegyületek szintén kémiai stresszorként jelennek meg, ezért az ACTH elválasztás vizsgálata a későbbiekben is esszenciális.

Ahogy már a bevezetésben bemutattuk a DA kritikus negatív regulációs szerepet tölt be a laktotrop és kortikotrop sejtek működésében. Szakirodalmi adatok alapján megállapítható, hogy az emlősök agyában több, anatómiailag is különböző katekolaminerg neuron populációt figyelhetünk meg. A DAerg neuronok három csoportja esszenciális inhibítora a hipofízis anterior lebenyében található excitatorikus

sejteknek. E neuronok közül kiemelendők a THDA DAerg neuronok, melyek az arcuate nucleus periventriculáris és kaudális régióiból erednek és az eminentia mediana externális zónájában végződnek. A THDA rendszer elemei az arcuate magvak rostrális zónájában lokalizáltak, terminuszuk a hipofízis anterior lebenyében található. A harmadik neuroncsoport a hipotalamikusan-periventriculáris nukleusból eredő PHDA DAerg neuronok melyek a hipofízis intermediális lebenyében végződnek. E strukturális egységek a target sejtekben sejtszintű válaszok indukciójáért felelősek (Moore, 1987; Chinta et al., 2005; DeMaria et al., 1999).

A fent említett neuron populációk bemutatását az indokolja, hogy az általuk kiváltott sejtszintű mechanizmusok értelmezésével az eredményeinkben tapasztalható változások magyarázatához analógiát szolgáltatassanak. Elektrofiziológiai tanulmányokból ismert, hogy a DA *in vivo* és *in vitro* adenohipofízis célsejtekben csökkenti az akciós potenciálját (Castelletti et al., 1989; Lacey et al., 1987). Kijelenthető, hogy a DA inhibítoros potenciált azáltal indukál, hogy a sejtmembránt hiperpolarizálja. Az inhibítoros potenciál az extracelluláris  $K^+$  konduktanciától jelentősen függ. Az extracelluláris  $[K^+]$  depolarizálja a membránt, míg az extracelluláris tér emelkedő  $[K^+]$ -ja a hiperpolarizáció kulcsfaktora (Tomita, 1972), mely membránpotenciál változások a sejtek excitabilitásával szorosan kapcsolatosak. Az exocitózis elektromos és protein kaskád mechanizmusok szabályozott rendszereként értelmezhető (Stojilkovic et al., 2010). Szakirodalmi adatok igazolják, hogy a mind a laktotrop, mind a korticotrop sejtekben a spontán elektromos aktivitás hormon szekrécióhoz kapcsolható (Freeman et al., 2000; Mason et al., 1988).

A belsőleg egyenirányított  $K^+$ -csatornák facilitálják az intracelluláris tér irányába megvalósuló  $K^+$  áramot a hiperpolarizáció során, melynek eredményeképpen döntően  $K^+$  influx valósul meg (Doyle et al., 1998). Továbbá e csatornák részt vesznek a nyugalmi membránpotenciál kialakításában is. Erős depolarizáció hatására történő záródásuk G-proteinek és IP3 metabolizmus modulációjához vezet (Wu et al., 2001).

Elektrofiziológiai tanulmányokból megállapíthatjuk, hogy az adenohipofízis sejtek felszínén a feszültség-függő  $K^+$ -csatornák négy különböző típusa magasan expresszált: a gyorsan aktiválódó késleltett egyenirányító, a lassan aktiválódó késleltetett egyenirányító, az A-típusú és az Ether-a-go-go  $K^+$ -csatornák (Stojilkovic et al., 2010). Excitabilis szövetekben az akciós potenciál frekvenciája ezen csatornák közreműködésével valósul meg (Schafer et al., 1999).

A Ca-aktivált  $K^+$ -csatornák szerkezeti felépítésükben hasonlóságot mutatnak a feszültség-függő  $K^+$ -csatornákkal, azonban alacsonyabb feszültség dependenciát mutatnak, valamint  $Ca^{2+}$  influx hatására aktiválódnak. Az exocitózis megindításában jelentőségük igazolt (Shao et al., 1999).

A megvalósuló  $Ca^{2+}$  influx számos olyan szignál transzdukciós útvonalat indukál, melyek potenciózzák a hormon felszabadítás mechanizmusát (Goor et al., 2001). Aktivált sejt felszíni receptorok mediálnak számos celluláris folyamatot, többek között G-protein felhasználást, és ciklikus-mononukleotid akkumulációt (Bauer et al., 2007).  $G_q/G_{11}$  proteinek aktivációja indukálja a membrán-kapcsolt PLC működését, mely katalizálja foszfatidilinozitol 4,5-bifoszfát hidrolízisét. E folyamatok eredményeképpen  $IP_3$  és DAG keletkezik (Freeman, 2000). Kortikotrop és laktotrop sejtekben az  $IP_3$  a non-mitokondriális  $Ca^{2+}$  felszabadításában jelentős szerepet tölt be. A DAG viszont aktiválja a  $Ca^{2+}$ -dependens protein-kináz-C-t és protein-kináz-B-t, melyek foszforilálják a feszültség-függő  $Ca^{2+}$ -csatornákat. E mechanizmus eredményeképpen jelentős  $Ca^{2+}$  influx valósul meg. A megemelkedett intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint hozzájárul a szekretoros vezikulák és a plazmamembrán fúziójához, a szolubilis NSF és SNAP receptor fehérje (SNARE) protein komplex közreműködésével (Brunger, 2000; Rickman et al., 2009).

A rendszer strukturális változásai a kontroll és a szabályozás által vezéreltek. A szabályozás igyekszik a rendszert egy adott állapotában megtartani, míg a kontroll folyamatok a rendszert különböző állapotokon keresztül viszik végig. Az extracelluláris ionmilieu változtatás által megformált kontroll folyamatok azonnali válaszreakcióra kényszerítik az adenohipofízis sejteket, melyek jól detektálhatóak a hormon release kinetikák módosulásaiban. Mivel az extracelluláris környezet állandóan változik a sejtnak ehhez alkalmazkodnia kell. A feltételezett hiperpolarizáció következtében csökkent hormon exocitózis rátát figyeltünk meg a magasabb, de még mindig hipokalémiás extracelluláris közeg hatására. A  $K^+$ -csatornák kinyílásának eredményeképpen  $K^+$  efflux valósul meg, az egyensúlyi folyamatok fenntartása érdekében.

Hipotézisünk szerint a hiperpolarizáció, mint inhibítoros potenciál  $G_{i-3\alpha}$  proteineken keresztül gátolja az AC aktivitást, amely így csökkent  $IP_3$  metabolizmushoz, végül csökkent intracelluláris  $Ca^{2+}$  szinthez vezet. A  $Ca^{2+}$  influx csökkenése gátolja a SNARE mediált ACTH és PRL tartalmú vezikulák plazmamembránnal történő asszociációját. Az ACTH és PRL release diszkrét emelkedésének extracelluláris hipo  $[K^+]$  módosítások hatására bekövetkező változásmintázatai idő és sejttypus dependenciát mutattak.

Expozíciós idő- és dózisfüggő módon, a laktotrop sejtekben a hiperpolarizációra visszavezethető hormonkinetika módosulás intenzívebben fejeződött ki, mint a kortikotrop sejtekben.

Az ember magas adaptációs és akkomodációs potenciálja révén alkalmas a társadalmi szintén zajló evolúció megvalósítására. Ebben a kontextusban az ember tevékenységével pl. a kemizáció során, a földi környezet minden elemére, és a közöttük fenn álló kapcsolatrendszerre is hatással van. A kemizáció rohamos fejlődésével pl. új vegyületeket állított elő a társadalom, melyek ugyan hatékonyan szolgálták az ember rövid távú igényeit, azonban az így szintetizált nagy kémiai stabilitású xenobiotikumok már jelentős hatásúak a biológiai rendszerek és környezetük között fennálló dinamikus egyensúlyban (Bigsby et al., 1999; Colborn et al., 1993). A széles körben elterjedt perzisztens szerves szennyező ágensek felhasználásával az élő szervezetek homeosztatisz egyensúlyi folyamataik eltolásával jelentős rendszerzavarokat idézhetnek elő. Ebben a vonatkozásban experimentális kísérleti protokollunkban a HD vegyületek közül kombinált CIB alkalmaztuk modell ágensekként. Az említett ágensek az extracelluláris ion milieu módosításával közvetlen hatást válthatnak ki az érintett sejtekben, szövetekben (2.2 fejezet). Organizmus szintjén azonban a visszacsatolási mechanizmusok következtében a HD vegyületek egy vagy több rendszerelem áttétlen keresztül közvetett hatást okozhatnak, az elsődleges (közvetlen) hatások mellett. Ennek vizsgálatához standardizált *in vivo* és *in vitro* vizsgálati modellrendszereket alakítottunk ki.

Korábbi vizsgálataink igazolták, hogy az alkalmazott kombinált CIB (0,1; 1,0 és 10 µg/ts.kg dózisú HCB és TCB 1:1 arányú keveréke) hatásai szubtoxikusak voltak, ugyanis a Wistar patkányok testtömege, szerveik tömege nem változott szignifikánsan a kontroll csoporthoz viszonyítva. A máj toxicitását jelölő enzimek, mint a szérumban a glutamát-oxálacetát-transzamináz (sGOT), a glutamát-piruvát-transzamináz (sGPT) és a gamma-glutamil-transzpeptidáz (sGGT) értékek az irodalmi adatok szerinti normál tartományban maradtak. Egyéb malformációkat sem detektáltunk (Valkusz et al., 2011). Jelen összefüggésekben, a stressz válaszok megindításában esszenciális szerepe van a HPA axis aktiválódásának, mely erős hipotalamikus kontroll alatt áll. A hipotalamusz és a magasabb limbikus agyi struktúrák alatt a parvocelluláris neuronok fokozott CRH release-zel válaszolnak, mely a portális keringés által az adenohipofízis anterior lebenyében található kortikotrop sejteket POMC expresszióra serkenti, melyből posztranszlációs módosításokkal ACTH alakul. Mindezek mellett az AVP is képes

potencírozni az ACTH release-t V1b receptorok közreműködésével (Sarkar et al., 2001; Bornstein et al., 1999; Lolait et al., 1995). Korábbi tanulmányainkban már igazoltuk, hogy a szubtoxikus dózisú CIB kezelések fokozzák az AVP elválasztást (Valkusz et al., 2011). A szubtoxikus CIB kezelések eredményeképpen megvalósuló proliferatív hatásokat hisztológiai vizsgálatainkkal jelen munkában igazoltuk. Az agyalapi mirigy  $\beta$ -sejt proliferációs aktivitás fokozódásának indirekt hátterében feltehetően a fokozódó AVP és CRH elválasztás játszhat esszenciális szerepet. Eredményeink szerinti ACTH elválasztás dózis- és időfüggő módon szignifikánsan emelkedett.

A fokozódó ACTH kulcsszerepet játszik mellékvese cortex regulációjában, mely számos patológias folyamaton mehet keresztül a megemelkedett szabályozó faktorok hatására (pl. adrenokortikális adenomák megjelenésében). Laws és mtsai. (2009) igazolták, hogy klórtiazin herbicidek toxikus dózisban alkalmazva aktiválják az ACTH dependens kortikoszteron szintézist hím Wistar patkányokban. Az ACTH a mellékvese kéregállományában lévő sejtekre proliferatív hatásokkal is bír (mitogén hatás), Fos (c-Fos, FosB, Fra1, Fra2) és Jun (c-jun, JunB, JunD) transzkripciós faktorok aktiválásával. Az aktivált transzkripciós faktorok homo-, illetve heterodimerizálódnak, ennek köszönhetően AP-1 komplex formálódik, mely kritikus szerepet játszik a  $G_1$ -S fázis tranzíciójában.

A környezetterhelések monitorozására alkalmas, enzim aktivitásváltozáson alapuló modell kidolgozását valósítottuk meg a  $Mg^{2+}$ -dependens ATPáz vizsgálatával. Ismeretes, hogy a citoplazmában lévő  $Mg^{2+}$  fontos szerepet játszik a  $Ca^{2+}$  triggerelt exocitózis mechanizmusában. E szerep kettős dimenzióban teljeseedik ki: először is a  $Mg^{2+}$ -dependens ATPáz diszkrét energiatranszfer mediátorként potencírozza az exocitózist, másodsorban az intracelluláris  $Mg^{2+}$  stabilizálja vezikuláris, hormon tartalmú protein komplexet (Wegenhorst et al., 1989; Torlinksa et al., 2004; Reinhart, 1988).

*In vivo* és *in vitro* eredményeinkből jól látszik, hogy a HD vegyületként viselkedő CIB enzimmel való direkt interakciójuk során fokozták a jelen ATPáz aktivitását. CIB expozíciót követően a  $Mg^{2+}$ -függő ATPáz aktivitásának szignifikáns emelkedését tapasztaltuk, amely fokozódó hormon exocitózisban manifesztálódott.

Szakirodalmi adatokból ismert, hogy a kortikotrop sejtekben a hormon exocitózis spontán elektromos membrán jelenségekhez kapcsolható (Stojilkovic et al., 2010). Ebben lényeges szerepe van a  $Mg^{2+}$  által vezérelt  $Ca^{2+}$  influxnak, mely a fent említett szignál transzdukciós útvonalakat aktivizálva potencírozza a hormon szekréciót. Az



aktivált sejtfelszíni receptorok intracelluláris kaszkád mechanizmusokat mediálnak, többek között G-protein mobilizációt, valamint ciklikus mononukleotid akkumulációt.

Az eredmények alapján megállapításainkat a célkitűzéseinkben megfogalmazott kérdések szerint csoportosítottuk és konkludált következtetéseinket a következőkben foglaltuk össze.

1. Hipokalémia által előidézett sejtszintű változások vizsgálatával végzett kutatásaink új információval szolgálnak. Eredményeink alapján jól látható, hogy a sejt és környezete funkcionális egységként determinisztikus rendszerszabályokkal jellemezhető. Igazoltuk, hogy ha a sejt bekerül egy adott állapotciklusba abból nem szabadul, ahhoz adaptálódik. Ezen folyamatok jól értelmezhetőek a  $K^+$  megvonás eredményeképpen lezajló apoptózis, valamint a hipokalémia által indukált hiperpolarizáció rendszerközpontú leírásában. Az ok-okozati viszonyt mechanizmus szinten jelen dolgozatban azonosítottuk, bemutattuk, összefüggéseiben jelen munkában először közöltük.

Az extracelluláris ionmilieu biztosítja a környezetből érkező jel-, és fenntartó inputokat, melyek a fent leírt mechanizmusokkal valósítják meg a sejt alkalmazkodását, mind normál, egészséges, valamint belső egyensúlyeltolással kiváltott transzformált endokrin funkciók esetében is.

Irodalmi adatok szerint különböző tumorok környezetében -az esszenciális monovalens kationok vonatkozásában- jelentős hipoionia detektálható. A bemutatott kísérleti protokoll alapján megállapíthatjuk, hogy a hipokalémia által indukált apoptotikus mechanizmus kaszkád a rendszer belső védelmi funkcióját képviseli.

A rendszer alkalmazkodásának kimenete exocitotikus kinetikákkal jellemezhető. Alapkutatásaink eredményeivel bemutatott válaszmechanizmusok és a kialakított modellrendszer új terápiás lehetőségek tervezéséhez jelenthet újszerű nézőpontot. Az ionhomeosztázis vizsgálata többek között azért is indokolt, mert számos HD vegyület jelentős mértékben képes modulálni a sejt rendszerének ioneqyensúlyát, ezzel jelentős rendszerzavarokat előidézve.

2. A HD vegyületek közé sorolható ClB fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságaik, valamint a társadalmi vonatkozásaik következtében igen széles körben elterjedtek, így vizsgálatukra alkalmas standardizált hatásmodellt alakítottunk ki, melyben e vegyületek expozítor szerepét igazoltuk.

Az extrém alacsony, szubtoxikus dózisú kombinált ClB kezelések -a leggyakoribb expozíciós útvonalat (táplálékon keresztüli kontaktus) reprezentáló módon- a kémiai stresszorok eredményeképpen felszabaduló ACTH szintjét *in vivo* és *in vitro* módosították, következményesen homeosztatikuss egyensúlyeltolódást indukálva. A mechanizmus szintű eredményprezentálás során megállapítottuk, hogy az alkalmazott ClB kezelések indirekt és direkt módon is hatással vannak a biotikus rendszerekre. Az általunk bevezetett HD vegyület fogalommal koherensen a ClB HD vegyületként is értelmezettek, és eredményeink szerint a diszkrét energiatranszfert módosítják, azaz szignifikáns módon zavarják meg az ionhomeosztázist.

Krónikus, szubtoxikus ClB kezelések eredményeképpen az adenohipofízis szövettanában strukturális változásokat váltottak ki, mely e perzisztens szerves vegyületek proliferatív hatásával hozható összefüggésbe.

## **7. Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretnék köszönetet mondani professzoraimnak, munkahelyi vezetőimnek, akik egész pályám alatt támogatták tudományos munkámat.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Gálfi Márta habilitált főiskolai tanárnak, aki hallgató korom óta kísérte és segítette munkámat, megmutatta a tudományos világ szépségeit, nehézségeit, akinek kreativitása és tudása ösztönzőleg hatott rám. Köszönöm, azt a környezettudományos gondolkodásmódot, amelyet igyekeztem magam is elsajátítani, és munkámban fúzionálni. Köszönöm Dr. Valkusz Zsuzsanna Tanárnőnek, hogy segített az endokrinológia szövevényes útvesztőin eligazodnom.

Köszönetemet fejezem ki az I sz. Belgyógyászati Klinika minden munkatársának, akik munkám során segítségemre voltak.

Köszönettel tartozom a megjelent munkákban szereplő összes szerzőtársamnak, elsősorban Dr. Radács Marianna főiskolai docensnek és Dr. Pálföldi Regina adjunktusnak, akik végig barátként támogattak.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm szüleimnek, testvéreimenk, akik végig támogattak, mellettem álltak, biztattak, nélkülük ez a munka nem készülhetett volna el.

## 8. Felhasznált irodalom

- Álvarez-Pedrerol M, Ribas-Fitó N, Torrent M, Carrizo D, Grimalt J O, Sunyer J 2007 Effects of PCBs, p,p'-DDT, p,p'-DDE, HCB and  $\beta$ -HCH on thyroid function in preschool children. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 65:452-457.
- Alexander F E, Patheal S L, Biondi A, Brandalise S, Cabrera M E, Chan L C, Chen Z, Cimino G, Cordoba J C, Gu L J, Hussein H, Ishii E, Kamel A M, Labra S, Magalhães I Q, Mizutani S, Petridou E, de Oliveira M P, Yuen P, Wiemels J L, Greaves M F 2001 Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. *Cancer Research* 61 2542-6.
- Andrews J E, Courtney K D, Donaldson W E 1988 Impairment of calcium homeostasis by hexachlorobenzene (HCB) exposure in Fischer 344 rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 23(3):311-20.
- Aron D C, Howlett T A 2000 Pituitary incidentalomas. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America* 29 205-221.
- Bauer C S, Woolley R J, Teschemacher A G, Seward E P. 2007 Potentiation of exocytosis by phospholipase C-coupled G-protein-coupled receptors requires the priming protein Munc13-1. *Journal Neuroscience*, 27 212–219.
- Bergland R, Page R 1970 Pituitary-brain vascular relations: A new paradigm. *Science* 204 18-24.
- Beuschlein F, Fassnacht M, Klink A, Allolio B, Reincke M 2001 ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation. *European Journal of Endocrinology* 144 199-206.
- Bigsby R, Chapin E R, Daston P G, Davis J B, Gorski J, Gray L E, Howdeshell K L, Zoeller R T, S. vom Saal F 1999 Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. *Environmental Health Perspectives* 107 613-618.
- Blanco G, Mercer R W 1998 Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *American Journal of Physiology: Renal Physiology* 275 633-650.

- Bloomquist J R 2003 Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 54:145–156.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly P A 1998 Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* 19 225–268.
- Bornstein R S, Chrousos G P 1999 Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84 1729-1736.
- Brann D W, Rao I M, Mahesh V B 1988 Antagonism of estrogen-induced prolactin release by progesterone. *Biology of Reproduction* 39 1067-1073.
- Brunger A T 2000 Structural insights into the molecular mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis. *Current Opinion in Neurobiology* 10 293–302.
- Camacho J 2006 Ether a` go-go potassium channels and cancer. *Cancer Letters* 233 1–9.
- Casanueva F F, Molitch M E, Schlechte J A, Abs R, Bonert V, Bronstein M D, Brue T, Cappabianca P, Colao A, Fahlbusch R, Fideleff H, Hadani M, Kelly P, Kleinberg D, Laws E, Marek J, Scanlon M, Sobrinho LG, Wass J A, Giustina A 2006 Guidelines of the Pituitary Society for the diagnosis and management of prolactinomas. *Clinical Endocrinology* 65 265-273.
- Castelletti L, Memo M, Missale C, Spano P F, Valerio 1989 A potassium channels involved in the transduction mechanism of dopamine D2 receptors in rat lactotrophs. *Journal of Physiology* 410 251-265.
- Ceccarelli B, Fesce R, Grohov F, Haimann C 1987 The effect of potassium on exocytosis of transmitter at the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology* 163-183.
- Ciccarelli A, Daly A F, Beckers A 2005 The epidemiology of prolactinomas. *Pituitary* 8 3-6.
- Chang W-P, Ye Y, Clevenger C 1998 Stoichiometric structure-function analysis of the prolactin receptor signaling domain by receptor chimeras. *Molecular and cellular Biology* 18 896-905

Charoenphandhu N, Teerapornpuntakit J, Methawasin M, Wongdee K, Thongchote K, Krishnamra N 2008 Prolactin decreases expression of Runx2, osteoprotegerin, and RANKL in primary osteoblasts derived from tibiae of adult female rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 86 240-8.

Chesnekova V, Melmed S 2002 Minireview: Neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules. *Endocrinology* 143 1571–1574.

Chinta S J, Andersen J K 2005 Cell in focus dopaminergic neurons. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37 942–946.

Clapp C, Torner L, Gutierrez-Ospina G, Alcantara E, Lopez-Gomez F J, Nagano M, Kelly P A, Mejia S, Morales M A, Martinez de la Escalera G 1994 The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14 kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Physiology* 91 10384-10388.

Colao A, Lombardi G 1998 Growth-hormone and prolactin excess. *Lancet* 352 1455-1461.

Colborn T, S. vom Saal F, Soto M A 1993 Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 101 378-384.

Cooper S 1998 Mammalian cells are not synchronized in G1-phase by starvation or inhibition: considerations of the fundamental concept of G1-phase synchronization. *Cell Proliferation* 31 9-16.

Davis M 1998 Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biological Psychiatry* 44 1239-1247.

De Bleecker J L, De Reuck J L, Willems J L 1992 Neurological aspects of organophosphate poisoning. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 94 93-103.

DeMaria J E, Lerant A A, Freeman M E 1999 Prolactin activates all three populations of hypothalamic neuroendocrine dopaminergic neurons in ovariectomized rats. *Brain Research* 837 236–241.

- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J P, C. Giudice L, Hauser R, S. Prins G, Soto A M, Zoeller R T, C. Gore A 2009 Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews* 30(4):293-342.
- Dotton A M 1999 The pituitary gland: embryology, physiology and pathophysiology. *Endocrine Series* 19 9-17.
- Doyle D A, Cabral M J, Pfuetzner R A, Kuo A, Gulbis J M, Cohen S L, Chait B T, MacKinnon R, 1998 The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280 69-77.
- Dussault J H, Ruel J 1987 Thyroid hormones and brain development. *Annual Review of Physiology* 49: 321-332.
- Edwards D P 2005 Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annual Reviews of Physiology* 67 335-76.
- Einhorn L C, Gregerson K A, Oxford G S 1991 D2 dopamine receptor activation of potassium channels in identified rat lactotrophs: whole-cell and single-channel recording. *The Journal of Neuroscience* 11 3727-3737.
- Endy D. 2005 Foundations for engineering biology. *Nature* 438: 449-453
- Fan T-J, Han L-H, Cong R-S, Liang J 2005 Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 37 719-727.
- Feinshreiber L, Singer-Lahat D, Ashery U, Lotan I 2009 Voltage-gated potassium channel as a facilitator of exocytosis. *Mechanisms of Exocytosis* 1152 87–92.
- Forti F L, Dias M H S, Armelin H A 2006 ACTH receptor: Ectopic expression, activity and signaling. *Molecular and Cellular Biochemistry* 293 147–160.
- Freeman M E, Kanyicska B, Lerant A, Nagy Gy 2000 Prolactin: Structure, function and regulation of secretion. *Physiological Reviews* 80 1523-1631.
- Gibbs D M, Vale W, Rivier J, Yen SSC 1986 Oxytocin potentiates the ACTH – releasing activity of CRF but not vasopressin. *Life Science* 34 2245-2249.
- Ghobrial I M, Witzig T E, Adjei A A 2005 Targeting apoptosis pathway in cancer therapy. *A Cancer Journal for Clinicians* 55 178-194.

Goel A, Aggarwal P 2007 Pesticide poisoning. *The National Medical Journal of India* 20 182-191.

Goor F V, Li Y-X, Stojilkovic S S 2001 Paradoxical role of large-conductance calcium activated  $K^+$  (BK) channels in controlling action potential-driven  $Ca^{2+}$  entry in anterior pituitary cells. *The Journal of Neuroscience* 21 5902–5915.

Gray L E Jr, Ostby J, Ferrell J, Rehnberg G, Linder R, Cooper R, Goldman J, Slott V, Laskey J 1989 A dose-response analysis of methoxychlor-induced alterations of reproductive development and function in the rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12(1):92-108.

Gross D S 1984 The mammalian hypophysial pars tuberalis: A comparative immunocytochemical study. *General and Comparative Endocrinology* 56 283-298.

Hamel A , Mergler D, Takser L, Simoneau L, Lafond J 2003 Effects of Low Concentrations of Organochlorine Compounds in Women on Calcium Transfer in Human Placental Syncytiotrophoblast. *Toxicological Science* 76 182-189.

Hanew K, Rennels E G 1982 Effects of culture age on PRL and GH responses to bromocriptine and somatostatin from primary cultures of rat anterior pituitary cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 171 12–18.

Hauger R L, Risbrough V, Brauns O, Dautzenberg F M 2006 Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: New molecular targets. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* 5 453-479.

Haynes A C, Jackson B, Chapman H, Tadayyon M, Johns A, Porter R A, Arch J R S 2000 A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regulatory Peptides* 96 45–51.

Herrington J, Carter-Su C 2001 Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism* 12 252-257.

Hilakivi-Clarke L, Cho E, Onojafe I, Raygada M, Clarke R 1999 Maternal exposure to genistein during pregnancy increases carcinogen-induced mammary tumorigenesis in female rat offspring. *Oncology Report* 6 1089–1095.



- Hill J, Chan S A, Kuri B, Smith C 2011 Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) recruits low voltage-activated T-type calcium influx under acute sympathetic stimulation in mouse adrenal chromaffin cells. *Journal of Biological Chemistry* 286 42459-42469.
- Ichiki T, Inagami T 1995 Expression, genomic organization, and transcription of the mouse angiotensin II type 2 receptor gene. *Circulation Research* 76 693–700.
- Igarashi-Migitaka J, Yamada S, Hara M, Sano T, Ozawa Y, Ohtani-Kaneko R, Hirata K 2003 Gene expression study of thyrotropin releasing hormone (TRH) receptor using RT-PCR: relationship to clinical and immunohistochemical phenotypes in a series of human pituitary adenomas. *Endocrine Journal* 50 459-467.
- Ings T C, Montoya J M, Bascompte J, Blüthgen J, Brown L, Dormann C F, Edwards F, Figuerosa D, Jacob U, Jones I, Lauridsen R B, Ledger M E, Lewis H M, Olesen J M, Frank van Veen F J, Warren P H, Woodward G 2009 Ecological networks – beyond food webs. *Journal of Animal Ecology* 78: 253–269.
- Janaky T, Szabo P, Kele Z, Balaspiri L, Varga C, Galfi M, Vecsernyes M, Gaspar L, Juhasz A, Laszlo F A, 1998 Identification of oxytocin and vasopressin from neurohypophyseal cell culture. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 12 1765–1768.
- Jigyasi J, Kundu R 2013 Effects of low dose dioxin on membrane bound ion dependent ATPases in mice kidney. *Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology* 2 43-48.
- Johnson M D, Woodburn C J, Vance M L 2003 Quality of life in patients with a pituitary adenoma. *Pituitary* 6 81-87.
- Jong H D 2002 Modeling and Simulation of Genetic Regulatory Systems: A Literature Review. *Journal of Computational Biology* 9: 67-103.
- Karaca Z, Tanriverdi F, Unluhizarci K, Kelestimur F 2010 Pregnancy and pituitary disorders. *European Journal of Endocrinology* 162 453–475.

- Karalis K P, Venihaki M, Zhao J, E. Van Vlerken L, Chandras C 2004 NF- $\kappa$ B participates in the corticotropin-releasing, hormone induced regulation of the pituitary proopiomelanocortin gene. *Journal of Biological Chemistry* 279 10837-10840.
- Kars M, Roelfsema F, Romijn J A, Pereira AM 2006 Malignant prolactinoma: case report and review of the literature. *European Journal of Endocrinology* 155 523-534.
- Kato Y, Kogure T, Sato M, Kimura R 1988 Effects of chlorobenzenes and their methyl sulfone metabolites on microsomal enzymes associated with drug metabolism in rat liver. *Journal of Pharmacobio-dynamics* 11 758-762.
- Kiess W, Gallaher B 1998 Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *European Journal of Endocrinology* 138 482-491.
- Kis G K, Ocskó T, Galfi M, Radaes M, Molnár Z, Rákos K, Molnár A h, László F, Varga C, László F A, 2011 The effects of orexins on monoaminergic-induced changes in vasopressin level in rat neurohypophyseal cell cultures. *Neuropeptides* 45 385-389.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler C W 2002 Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285 1-24.
- Kitano H 2002 Systems Biology: A brief overview. *Science* 295 1662-1664.
- Kow L-M, Pfaff D W, 2009 Membrane-initiated estrogen actions on ion channels and the induction of lordosis, the rodent female sexual behaviour. *Chinese Journal of Physiology* 52 175-195.
- Kunii K, Yamanaka A, Nambu T, Matsuzaki I, Goto K, Sakurai T 1999 Orexinsrhypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Research* 842 256-261.
- Lacey M G, Mercuri N B, North R A 1987 Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *The Journal of Physiology* 392 397-416.
- Laszlo A, Krippner S 1997 Systems Theories: their origins, foundations, and development. *Systems Theories and A Priori Aspects of Perception* 3: 47-74.
- Larsen P R, Kronenberg H M, Melmed S, Polonsky K S 2003 *Williams Textbook of Endocrinology*, 10th edition, Philadelphia, WB Saunder.

- Laws C S, Hotchkiss M, Ferrell J, Jayaraman S, Mills L, Modic W, Tinfo N, Fraites M, Stoker T, Cooper R 2009 Chlorothiazine herbicides and metabolites activate an ACTH-dependent release of corticosterone in male Wistar rats. *Toxicological Sciences* 112 78-87.
- LeDoux J E, Iwata J, Cicchetti P, Reis D J 1988 Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. 1. *The Journal of Neuroscience* 8 2517-2529.
- Legros J J 2001 Inhibitory effect of oxytocin on corticotroph function in humans: are vasopressin and oxytocin ying-yang neurohormones. *Psychoneuroendocrinology* 26 649-655.
- Le Moli R, Endert E, Fliers E, Mulder T, Prummel M F, Romijn J A, Wiersinga W M 1999 Establishment of reference values for endocrine tests. II: Hyperprolactinemia. *The Netherlands Journal of Medicine* 55 71-75.
- Lieberman M E, Maurer R A, Gorski J 1978 Estrogen control of prolactin synthesis in vitro. *Biochemistry* 75 5946-5949.
- Likic V A, McConville M J, Lithgow T, Bacic A 2010 Systems Biology: The next frontier for bioinformatics. *Advances in Bioinformatics* 2010: 1-10.
- Liu N A, Huang H, Yang Z, Herzog W, Hammerschmidt M, Lin S, Melmed S 2003 Pituitary corticotroph ontogeny and regulation in transgenic zebrafish. *Molecular Endocrinology* 17 959-966.
- Liu T-C, Jackson G L 1988 Actions of 17 $\beta$ -estradiol on gonadotropin release induced by drugs that activate intracellular signal transduction mechanisms in rat anterior pituitary cells. *Biology of Reproduction* 39 787-796.
- Lolait J S, O'Carroll A M, Mahan C L, Felder C C, Button C D, Scott W, Mezey É, Brownstein J M 1995 Extrapituitary expression of the rat V1b vasopressin receptor gene. *Neurobiology* 92 6783-6787.
- Lopponen T, Saukkonen A L, Serlo W, Tapanainen P, Rukonen A, Lanning P, Knip M 1998 Pituitary function in children with hydrocephalus before and after the first shunting operation. *European Journal of Endocrinology* 138 170-175.

- Lotfi C F P, Lepique A P, Forti F L, Schwindt T T, Eichler C B, Santos M O, Rebustini I T, Hajj G N M, Juliano L, Armelin H A 2000 Proliferative signaling initiated in ACTH receptors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33 1133-1140.
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J, 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193 265–275.
- Martin J B, Dotty D M 1949 Determination of inorganic phosphate. Modification of isobutyl alcohol procedure. *Analytical Chemistry* 21 965-967.
- Mason W T, Rawlings S R, Cobbett P, Sikdar S K, Zorec R, Akerman S N, Benham C D, Berridge M J, Cheek T, Moreton B 1988 Control of secretion in anterior pituitary cells- linking ion channels, messengers and exocytosis. *The Journal of Experimental Biology* 139 287-316.
- Matsushita N, Kato Y, Shimatsua A, Katakamia H, Yanaihara N, Imura H 1983 Effects of VIP, TRH, GABA and dopamine on prolactin release from superfused rat anterior pituitary cells. *Life Sciences* 32 1263–1269.
- Mattason M P, Liu D Mitochondrial potassium channels and uncoupling proteins in synaptic plasticity and neuronal cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304 539–549.
- McChesney R, Sealfon S C, Tsutsumi M, Dong K W, Roberts J L, Bancroft C 1991 Either isoform of the dopamine D2 receptor can mediate dopaminergic repression of the rat prolactin promoter. *Molecular and Cellular Endocrinology* 79 1-7
- Molnár Z, Pálföldi R, László A, Radács M, László M, Hausinger P., Tiszlavicz L, Rázga Z, Valkusz Z, Gálfi M 2014 The effects of hypokalaemia on the hormone exocytosis in adenohypophysis and prolactinoma cell culture modell systems. *Experimental and clinical Endocrinology and Diabetes* 122 575-581.
- Moore K E 1987 Interactions between prolactin and dopaminergic neurons. *Biology of Reproduction* 36 47-58.
- Moore K, Persaud T 1998 *Developing human: Clinically Oriented Embriology*, 6th edition, Philadelphia, WB Saunders.

- McChesney R, Sealfon S C, Tsutsumi M, Dong K W, Roberts J L, Bancroft C, 1991 Either isoform of the dopamine D2 receptor can mediate dopaminergic repression of the rat prolactin promoter. *Molecular and Cellular Endocrinology* 79 1-7.
- McLachlan J A, Newbold R R, Bullock B C 1980 Long-term effects on the female mouse genital tract associated with prenatal exposure to diethylstilbestrol. *Cancer Research* 40 3988–3999.
- Musso C G, Oreopoulos D G 2011 Aging and Physiological Changes of the Kidneys Including Changes in Glomerular Filtration Rate. *Nephron Physiology* 119 1-5
- Nakamura T, Kataoka K, Fukuda M, Nako H, Tokutomi Y, Dong Y-F, Ichijo H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S 2012 Critical role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in aldosterone/salt-induced cardiac inflammation and fibrosis. *Hypertension* 54 544-551.
- Ocskó T, Galfi M, Radács M, Molnár Z, Kis G K, Rákosi K, Molnár A H, László F, László F A, Varga C 2012 Effects of orexin-monoaminergic interactions on oxytocin secretion in rat neurohypophyseal cell cultures. *Regulatory Peptides* 175 43-48.
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B 2000 Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology*, 9 383-397.
- Oehlmann J, Stroben E, Schulte-Oehlmann U, Bauer B, Fiorini P, Markert B 1996 Tributyltin biomonitoring using prosobranchs as sentinel organisms. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 354 540-545.
- Ohno K, Sakurai T 2008 Orexin neuronal circuitry: Role in the regulation of sleep and wakefulness. *Frontiers in Neuroendocrinology* 29 70–87.
- Olsen C M, Meussen-Elholm E T M, Samuelsen M, Holme J A, Hongslo K 2003 Effects of the environmental oestrogens bisphenol A, tetrachlorobisphenol A, tetrabromobisphenol A, 4-hydroxybiphenyl and 4,4'-dihydroxybiphenyl on oestrogen receptor binding, cell proliferation and regulation of oestrogen sensitive proteins in the human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmacology & Toxicology* 92 180-188.
- O'Shea J J, Gadina M, Schreiber R D 2002 Cytokine signaling in 2002: New surprises in the Jak/Stat pathway. 109 121-131.

- O'Reilly A, Khambay B P S, Williamson M S, Field L M, Wallace B A, Davies T G E 2006 Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochemical Journal* 396 55-263
- Pancrazio J J, Tabbara I A, Kim Y I 1993 Voltage-activated K<sup>+</sup> conductance and cell proliferation in small cell-lung cancer. *Anticancer Research* 13 1231-1234.
- Qian L, Lopez V, Seo Y A, Kelleher S L 2009 Prolactin regulates ZNT2 expression through the JAK2/STAT5 signaling pathway in mammary cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 297 369 377.
- Ramiro-Cortés Y, Guemez-Gamboa A, Morán J 2011 Reactive oxygen species participate in the p38-mediated apoptosis induced by potassium deprivation and staurosporine in cerebellar granule neurons. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 43 1373–1382.
- Rao S M, Mayer A R, Harrington D L 2001 The evolution of brain activation during temporal processing. *Nature Neuroscience* 4 317–323.
- Raymond-Delpech V, Matsuda K, Sattelle B M, Rauh J J, Satelle D B 2005, Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invertebrate Neuroscience* 5 119–133.
- Reed J C 1998 Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17 3225-3236.
- Regoli D, Boudon A, Fauchere J L 1994 Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacology Reviews* 46 551–599.
- Reinhart A R 1988 Magnesium metabolism: a review with special reference to the relationship between intracellular content and serum levels. *Archives of Internal Medicine* 148 2415-2420.
- Restrepo-Angulo I, De Vizcaya-Ruiz A, Camacho J 2010 Ion channels in toxicology. *Journal of Applied Toxicology* 30 497-512.
- Rettori V, Milenkovic L, Riedel M, McCann S M. 1990 Physiological role of neuropeptide Y (NPY) in control of anterior pituitary hormone release in the rat. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 24 37–45.

- Rickman C, Medine C N, Dun A R, Moulton D J, Mandula O, Halemani N D, Rizzoli S O, Chamberlain L H, Duncan R R 2010 t-SNARE protein conformations patterned by the lipid microenvironment. *Journal of Biological Chemistry* 285 13535–13541.
- Ritchie A K 1987 Two distinct calcium-activated potassium currents in a rat anterior pituitary cell line. *Journal of Physiology* 385 591-609.
- Roy B N, Reid R L, Van Vugt D A 1999 The effects of estrogen and progesterone on corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin messenger ribonucleic acid levels in the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus of the rhesus monkey. *Endocrinology* 140 2191- 8
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli R M, Tanaka H, Williams S C, Richardson J A, Kozlowski G P, Wilson S, Arch J R S, Buckingham R E, Haynes A, Carr S A, Annan R S, McNulty D E, Liu W-S, Terrett J A, Elshourbagy N A, Bergsma D J, Yanagisawa M 1998 Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92 573-585.
- Sanchez E, Vargas M A, Singru P S, Pascual I, Romero F, Fekete Cs, Charli J L, Lechan R M 2009 Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology* 150 2283-2291.
- Saper C B, Lu J, Chou T C, Gooley J 2005 The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends in Neurosciences* 28 152-157.
- Sarkar D, Imai T, Kambe F, Shibata A, Ohmori S, Siddiq A, Hayasaka S, Funahashi H, Seo H 2001 The human homolog of diminuto/Dwarf1 gene (hDiminuto): A novel ACTH-responsive gene overexpressed in benign cortisol-producing adrenocortical adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86 5130-5137.
- Schafer R, Wulfsen I, Behrens S, Weinsberg F, Bauer C K, Schwarz J R 1999 The erg-like potassium current in rat lactotrophs. *Journal of Physiology* 518.2 401-416.
- Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B, Oehlmann J, Watermann B, Scherf S 2000 Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part II: Triphenyltin as a xeno-androgen. *Ecotoxicology* 9 399-412.

- Schwartz M W, Woods S C, Porte D, Seeley R J, Baskin D G 2000 Central nervous system control of food intake. *Nature* 404 661-671.
- Serri O, Chik C L, Ur E, Ezzat S 2003 Diagnosis and management of hyperprolactinemia. *Medical Association Journal* 169 575-581.
- Shao L-R, Halvorsrud R, BorgGraham L, Storm J F 1999 The role of BK type  $\text{Ca}^{2+}$  dependent  $\text{K}^{+}$  channels in spike broadening during repetitive firing in rat hippocampal pyramidal cells. *Journal of Physiology* 521.1 135—146.
- Shieh C C, Coghlan M, Sullivan J P, Gopalakrishnan M 2000 Potassium channels: Molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacological Reviews* 52 557–593.
- Sherr C J, Roberts J M 1995 Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes and Development* 9 1149-1163.
- Shipston M J, Armstrong D L 1996 Activation of protein kinase C inhibits calcium-activated potassium channels in rat pituitary tumour cells. *Journal of Physiology* 493.3, 665-672.
- Siegel G J, Albers R W, Brady S T, Price D L 2006 *Basic Neurochemistry Molecular, cellular, and Medical Aspects*. 6th edition China Elsevier Academic Press.
- Simon H-U, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. 2000 Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5 415–418.
- Slee E A, Adrian C, Martin S J 1999, Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 6 1067-1074.
- Somers W, Ultsch M, De Vos A, Kossiakoff A A 1994 The X-ray structure of a growth hormone–prolactin receptor complex. *Nature* 372, 478 – 481
- Spada A 1998 Growth factors and human pituitary adenomas. *European Journal of Endocrinology* 138 255 257
- Stojilkovic S S, Tabak J, Bertram R 2010 Ion Channels and signaling in the pituitary gland. *Endocrine Reviews*, 6 845–915.



- Sun X-M, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf B B, Green D R, Cohen G M 1999 Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 274 5053-5060.
- Suvetha L, Ramesh M, Saravanan M 2010 Influence of cypermethrin toxicity on ionic regulation and gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity of a freshwater teleost fish *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 29 44–49.
- Tejada F, Penafiel R, Pinilla L, Cremades A 2002 Influence of different neural systems on the secretion of sex hormones in potassium deficient mice. *Life Sciences* 71 1511–1521.
- Tollet-Egnel P, Flores-Morales A, Stavreus-Evers A, Sahlin L, Norstedt G 1999 Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology* 140 3693-3704.
- Tomita T 1972 Conductance change during the inhibitory potential in the guinea pig taenia coli. *Journal of Physiology* 225 693-703.
- Torlinska T, Grochowalska A 2004 Age-related changes of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activities in rat brain synaptosomes. *Journal of Physiology and Pharmacology* 55 457-465.
- Tsai K-H, Wang W-J, Lin C-W, Pai P-Y, Lai T-Y, Tsai C-Y, Kuo W-W 2012 NADPH oxidase-derived superoxide anion-induced apoptosis is mediated via the JNK-dependent activation of NF-kappa B in cardiomyocytes exposed to high glucose. *Journal Of Cellular Physiology* 227 1347-1357.
- Ueno H, Yoshimura M, Nakayama M, Yamamuro M, Nishijima T, Kusuhara K, Nagayoshi Y, Kojima S, Kaikita K, Sumida H, Sugiyama S, Ogawa H 2010 Clinical factors affecting serum potassium concentration in cardio-renal decompensation syndrome. *International Journal of Cardiology* 138 174-181.
- Valkusz Z, Nagyéri G, Radács M, Ocskó T, Hausinger P, László M, László F A, Juhász A, Julesz J, Pálföldi R, Gálfi M 2011 Further analysis of behavioral and endocrine consequences of chronic exposure of male Wistar rats to subtoxic doses of endocrine disruptor chlorobenzenes. *Physiology & Behavior* 103(5):421-30.

- Vaur S, Bresson-Bepoldin L, Dufy B, Tuffet S, Dufy-Barbe L 1998 Potassium channel inhibition reduces cell proliferation in the GH3 pituitary cell line. *Journal of Cellular Physiology* 177 1097-1107.
- Verma G, Malabika D. 2012 The critical role of JNK in the ER-mitochondrial crosstalk during apoptotic cell death. *Journal of Cellular Physiology* 227 1791–1795.
- Visser-Wisselaar H A, Van Uffelen C J C, Van Koetsveld P M, Lichtenauer-Kaligis E G, Waaijers A M, Uitterlinden P, Mooy D M, Lamberts S W J, Hofland L J 1997 17- $\beta$ -estradiol dependent regulation of somatostatin receptor subtype expression in the 7315b prolactin secreting rat pituitary tumor in vitro and in vivo. *Endocrinology* 138 1180-1189.
- Wong B S, Lecar H 1982 Single calcium-dependent potassium channels in clonal anterior pituitary cells. *Biophysical Journal* 39 313-317
- Wegenhorst U, Gratzl M, Föhr K J, Anhert-Hilger G 1989 Millimolar concentrations of free magnesium enhance exocytosis from permeabilized rat pheochromocytoma (PC 12) cells. *Neuroscience Letters* 106 300-306.
- Westerhoff H V, Palsson B O 2004 The evolution of molecular biology into systems biology. *Nature Biotechnology* 22: 1249-1252.
- Wu S-N, Lo Y-K, Kuo B I-T, Chiang H-T 2001 Ceramide inhibits the inwardly Rectifying potassium current in GH3 lactotrophs. *Endocrinology* 142 4785-4794.
- Xu B, Sano T, Yamada S, Li C C, Hirokawa M 2000 Expression of corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human pituitary corticotroph adenomas associated with proliferative potential. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85 1220- 5.
- Yamanaka A, Beuckmann C T, Willie J T, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanigasawa M, Sakurai T 2003 Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38 701–713.
- Yang Y, Chen M, Kesterson R A, Harmon C M 2007 Structural insights into the role of the ACTH receptor cysteine residues on receptor function. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293 1120-1126.

Zahm S H, Ward M H 1998 Pesticides and childhood cancer. Environmental Health Perspectives, 106 893-908.

## 9. Összefoglalás

A biológiai rendszerek determinált környezeti feltételek mellett képesek működni. E rendszerek a környezetükből (pl. extracelluláris környezetükből) a belső homeosztatikus hálózatok fenntartásáért inputokat vesznek fel, melyek a rendszer alkalmazkodási hálózatait indukálják. Az élő rendszer és a környezete között fennálló állandó kölcsönhatás, illetve energia- és anyagáramlás konfidenciálisan értelmezett egyensúlya pl. a neuro-endokrin kommunikáció által valósul meg. Az emberi társadalom szükségletei és igényei kielégítése érdekében viszont a külső környezeti feltételeket tudatosan átalakította. Ezen tevékenységekből fakadó környezeti feltétel módosulások szükségszerűen megváltoztatják az élő rendszerek belső egyensúlyi alkalmazkodási mintázatait. Az endokrin diszruptor vegyületek (EDC) a kemizáció során létrehozott olyan xenobiotikumok, amelyek strukturális rendszerzavart okoznak a neuroendokrin kommunikáció aktiválásával. Az organizmus szintjén a teljes homeosztatikus vertikumot érintő hatások az anyagcserehálózatok működésén át értelmezettek, így ezen hatásokért felelős vegyületeket jelen munkában *homeosztatikus diszruptor* (HD) ágensként értelmezzük.

A neuro-endokrin rendszer a belső egyensúlyt számos szteroid típusú vegyülettel is modulálhatja. Ilyenek lehetnek az ösztrogén típusú vegyületek is, amelyek szerepe a modern társadalmakban kiemelt jelentőségű, hiszen pl. HD típusú vegyületek bomlássorozatai során melléktermékként keletkezhetnek, illetve az antikoncipiens szerek hatóanyagát is képezhetik. Nemzetközi kutatások adataiból megállapítható, hogy az ösztrogén ER $\alpha$ , ER $\beta$  receptorokon keresztül stimulálja a PRL szintézisét és expresszióját, ezzel prolaktinómát (PRLoma) is indukálhat endokrin regulációs zavar kiváltással.

A sejt, mely extracelluláris környezetével egyensúlytartásra képes nyílt rendszer, endo-, és exocitotikus mechanizmusait az extracelluláris ion milieu-re jellemzően határozza meg. A citózisokat, mint makroállapotokat jellemzően a domináns mikroállapotok valósítják meg, mint pl. a töltésvándorlásból fakadó membrán polaritásváltozások.

Jelen munkában a célkitűzéseinket két problémakörbe csoportosítottuk:

1. Az extracelluláris ionmilieu-ben bekövetkező hipoionia által indukált regulációs sejt válaszok számos élettani folyamatban igen jelentős homeosztatikus egyensúly eltolódást iniciálnak. Az extracelluláris ionmilieu (mint környezeti feltétel)

változtatásával kiváltott hipokalémia és a kapcsolt sejtszintű mechanizmusok vizsgálata során a következők voltak a célkitűzéseink:

- a. A környezeti feltételváltozások tanulmányozásra alkalmas, olyan standardizált *in vitro* modell rendszer kidolgozása, amelyben a PRL és ACTH szekréciójának nyomon követése megvalósítható normál és belső egyensúly eltolásával kiváltott transzformált endokrin funkciók esetében.
  - b. Vizsgálatainkban az egészséges, primer monolayer adenohipofízis sejt kultúrák, hipokalémia által kiváltott sejtszintű alkalmazkodási mintázatainak értelmezése és megismerése.
  - c. Tanulmányozni kívántuk, hogy az extrém alacsonytól az fiziológiai egyensúlyi koncentrációig változó extracelluláris  $K^+$ -milieu, miképpen befolyásolja az exocitózis mechanizmusát adenohipofízis és prolaktinomás adenohipofízis sejt kultúrákban.
  - d. Kiemelt figyelmet fordítottunk annak tanulmányozására is, hogy a megváltozott szabályozással bíró transzformált sejtpopulációk válaszmechanizmusait miként módosíthatja a hipokalémiás extracelluláris környezet.
2. A társadalmakban a kémiai környezetterhelő ágensek nagyarányú felhasználása következtében a xenobiotikumok krónikus és/vagy akut egészségügyi hatásaival is számolni kell, ezért vizsgálatainkban célul tűztük ki a következőket:
- a. Standardizált *in vivo* és *in vitro* modellrendszer kialakítását, melyben a szubtoxikus koncentrációjú, krónikus CLB expozítor szerepe tanulmányozható.
  - b. A neuroendokrin szabályozásban esszenciális szerepet játszó ACTH release mechanizmusok HD vegyületek hatására bekövetkező modulációjának vizsgálatát.

- c. A HD vegyületek által sejtszinten értelmezett, diszkrét energiatranszfer változások nyomon követését  $Mg^{2+}$ -dependens ATPáz aktivitásának tanulmányozásával.
- d. A szubtoxikus koncentrációjú kombinált CLB kezelés strukturális zavarokat indukáló hatásaival morfológiai és biokémiai detektálását az adenohipofízisben.

A célkitűzésekben megfogalmazottak alapján először az extracelluláris ionmilieu változásával nyomonkövetett hormonkinetikák eredményeinek prezentálását valósítottuk meg. Megvizsgáltuk az ACTH, mint stresszhormon release kinetikáját különböző extracelluláris  $K^+$  koncentrációk függvényében, egészséges AdH sejtpopulációk esetén. Az idő függvényében a felülúszó médium hormonkoncentrációja szignifikánsan csökkent a kontroll csoporttal összehasonlítva. Ezt követően az alkalmazott  $[K^+]$  expozíciók hatására bekövetkező hormonelválasztást tanulmányoztuk PRLoma sejtpopulációban. A stresszhormon elválasztásában kezdetben magasabb, majd az idő múlásával a 1,5 és 2,0 mM-os  $K^+$  kezelést követően csökkent ACTH szintet detektáltunk. 1, 0,5 és 0 mM-os  $K^+$  kezelést követően a kontroll csoporthoz viszonyítva a felülúszó médium emelkedett hormonszintjét detektáltunk.

Eredményeink szerint a különböző a magasabb  $K^+$  koncentrációjú, de még hipoionias extracelluláris ionmilieu hatására az idő függvényében a PRL hormonelválasztás csökkenését detektáltuk normál AdH esetében, mely a sejtek adaptív képességével függ össze. Az alkalmazkodás a membrán hiperpolarizációjával állhat kölcsönhatásban, amely mint inhibítoros potenciál realizálódik. Hasonló összefüggéseket tártunk fel magasabb (de a homeosztatikusnál kisebb)  $K^+$  koncentrációjú extracelluláris ionmilieu eredményeként az idő függvényében PRLoma sejtpopulációk PRL elválasztásánál.

A következőkben az egészséges és kezelt AdH és prolaktinóma adenohipofízis sejt kultúrák hipokalémiás közeg hatására bekövetkező PRL elválasztási kinetikáját hasonlítottuk össze. Az idő függvényében (0-90 min) a felülúszó médiumban magasabb hormonszintet detektáltunk, a kontroll csoporttal összehasonlítva. Az alkalmazkodás jelen esetben az apoptózissal, mint új állapotciklus megjelenésével értelmezhető (kaspáz emésztő enzimek következtében felbomló membrán struktúrák).

Megvizsgáltuk a monolayer sejt kultúrák anti-apoptotikus Bcl-2 protein produkcióját is normál és hipokalémiás közegben, mely során megállapítottuk, hogy a kezelt sejt kultúrák Bcl-2 produkciója alacsonyabb volt a kontroll csoporttal összehasonlítva.

A tanulmányozott HD ágensek az extracelluláris ionmilieu módosításával közvetlen hatást válthatnak ki az érintett sejtekben, szövetekben, ugyanakkor magasabb rendszerszinteken (pl. organizmus szintjén) azonban a visszacsatolási mechanizmusok következtében a vegyületek közvetett hatást okozhatnak. A második fő célkitűzési tématerületben a kémiai környezetterhelő ágensek hatásaira bekövetkező diszkrét egyensúlyeltolódások vizsgálatát kívántuk megvalósítani. Az alkalmazott CIB kezelés (0,1; 1,0 és 10,0  $\mu\text{g}/\text{ts. kg}$  dózis) a kezelési időtartam függvényében (0, 30, 60, 90 nap) mind a szérum, mind a monolayer sejt kultúrák ACTH elválasztását modulálta. A kontroll csoporthoz viszonyítva az alkalmazott szubtoxikus dózisé CIB expozíciók az ACTH elválasztását fokozták a kísérleti állatokban. Hasonlóan a vizsgált dózisok a  $\text{Mg}^{2+}$ -dependens ATPáz aktivitását is szignifikánsan emelték a kezeletlen csoporttal összehasonlítva. A szövettani vizsgálatok eredményei szerint a 10  $\mu\text{g}/\text{ts. kg}$  dózisé kombinált CIB expozíció kezelés után az ACTH specifikus immunreakció eredményeképpen, lényegesen intenzívebb ACTH immunpozitivitás volt megfigyelhető, a kezeletlen, kontroll csoporttal szemben.

Jelen munka konkludált következtetéseit a következőkben foglaltuk össze.

1. Hipokalémia által előidézt sejt szintű változások vizsgálatával végzett kutatásaink új információval szolgálnak.
  - a. Eredményeink alapján a kutatásainkhoz jelen munkában kialakított standardizált *in vivo* és *in vitro* vizsgálatokkal jól látható, hogy a sejt és környezete funkcionális egységként determinisztikus rendszerszabályokkal jellemezhető. Igazoltuk, hogy amennyiben a sejt bekerül egy adott állapotciklusba abból nem szabadul, ahhoz adaptálódik (apoptózis, membrán hiperpolarizáció).
  - b. Az extracelluláris ionmilieu biztosítja a környezetből érkező jel-, és fenntartó inputokat, melyek az általunk feltárt mechanizmusokkal valósítják meg a sejt alkalmazkodását, mind normál, egészséges, valamint belső egyensúlyeltolással kiváltott transzformált endokrin funkciók esetében is.
  - c. Irodalmi adatok szerint különböző tumorok környezetében (az esszenciális monovalens kationok vonatkozásában) jelentős hipoionia detektálható. A

bemutatott kísérleti protokoll alapján megállapíthatjuk, hogy a hipokalémia által indukált apoptotikus mechanizmus kaszkád a rendszer belső homeosztatikus védelmi funkcióját képviseli.

- d. Alap kutatásaink eredményeivel bemutatott válaszmekanizmusok és a kialakított modellrendszer új terápiás lehetőségek tervezéséhez járulhat hozzá.

- 2. A HD vegyületek közé sorolható CIB fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságaik, valamint a társadalmi vonatkozásaik következtében igen széles körben elterjedtek, így vizsgálatukra alkalmas standardizált hatásmodellt alakítottunk ki, melyben e vegyületek expozítor szerepét igazoltuk.

- a. Az extrém alacsony, szubtoxikus dózisú kombinált CIB kezelések (a leggyakoribb expozíciós útvonalat /táplálékon keresztüli kontaktus/ reprezentáló módon) a kémiai stresszorok hatására felszabaduló ACTH szintjét *in vivo* és *in vitro* módosították, amely következményesen homeosztatikus egyensúlyeltolódást indukálhat.
- b. A mechanizmus szintű eredményprezentálás során megállapítottá vált, hogy az alkalmazott CIB kezelések indirekt és direkt módon is hatással vannak a biotikus rendszerekre.
- c. A HD vegyületek a diszkrét energiatranszfert a  $Mg^{2+}$ -dependens ATPáz működésének fokozásával is módosítják.
- d. Krónikus, szubtoxikus CIB kezelések eredményeként az adenohipofízis szövettanában strukturális változásokat detektáltunk, amely e perzisztens szerves vegyületek proliferatív hatásával hozható összefüggésbe.



## 10.Summary

Biological objects exist in determined environmental condition. These objects take inputs from their environment to maintain their inner homeostatic balance, which can induce the system accommodation processes. Persistent interaction evolves among living creatures and their environment. This connection among the biotic and abiotic systems can materialize e.g. with the neuro-endocrine communication. Nowadays the most complex evolutionary scene is the society, in which the human performers to maintain their existence can modify their environment.

The endocrine disruptor compounds (EDC) are xenobiotics produced by the chemization. However the society to supply its wants and needs can alter its environment. These condition alterations can modify the accommodation patterns of living organisms. Various benzene derivates such as alkylbenzenes and chlorobenzenes (CIB), however, continue to be used as chemical intermediates, solvents, pesticides in spite of incomplete knowledge of their chronic toxicity. Several chlorinated benzenes are known to be porphyrogenic, carcinogenic, mutagenic in animals and humans. In this context the EDC are homeostatic disruptor (HD) agents.

Steroid hormones, mainly estrogen, are known to modify the neuro-endocrine system. A rapid increase in the rate of prolactin (PRL) synthesis was detected both in vivo and in vitro with estradiol treatment. Recent papers have revealed that estrogen may induce prolactinoma (PRLoma) by stimulating cell signaling mechanisms such as protein kinase activity, thus potentiating hormone exocytosis.

The cell and its external milieu comprise an operational unit as a persistent and dynamic contact evolves among the living structure and its environment. The extracellular ion milieu determines the endo- and exocytosis mechanisms.

*Our aims were:*

1. We wanted to investigate the cellular mechanisms under hypokalaemic effects, because the effect of extracellular hypoionic conditions on cellular functions is intriguing and likely important factor in a number of pathologies.

- a. To investigate cellular phenomena, we wanted to develop *in vitro* model systems, namely primary monolayer adenohipophysis (AdH) and PRLoma cell cultures and their cellular function were wanted to standardize.
  - b. We intended to investigate response mechanisms in the function of normal, monolayer, primary AdH cell cultures at low extracellular  $[K^+]$ .
  - c. We also wanted to investigate the hormone release of PRLoma at different extracellular  $K^+$  milieu, ranging from low to normal  $K^+$  levels.
  - d. We also examined the mechanisms for the extracellular hypokalaemic effects on hormone exocytosis by the altered regulated, transformed cell populations.
2. The environmental pollution by HD agents may have chronic and/or acute effects on the living organisms.
    - a. We aimed to develop a standardized *in vivo* and *in vitro* research model to study the subtoxic concentration and the expositor role of ClB.
    - b. This paper focus on the central adrenocorticotrophic hormone (ACTH) release in the pituitary by the effects of combined, extremely low-dose, long-term, pre-standardized ClB treatment.
    - c. We wanted to draw attention the effects of subtoxic exposition of ClB on the  $Mg^{2+}$ -dependent ATPase activity.
    - d. We endeavoured to examine the morphology and structure of AdH tissues by the effects of combined exposure of ClB treatment.

Differences between the effects of hypokalaemia on normal adenohipophysis cultures and prolactinoma cell populations were investigated. Significant alteration ( $p < 0.001$ ,  $n=10$ ) in hormone exocytosis was detected in  $K^+$  treated adenohipophyseal and prolactinoma cell cultures compared to untreated groups. According to our results under higher, but still hypokalaemic conditions the PRL release was reduced depending on duration of exposure in AdH. The PRL release was reduced in PRLoma cell populations compared with the control groups. In these processes the accommodation was played a key role. The decrease in hormone exocytosis was tightly correlated to the extracellular  $K^+$  in both cell types, leading to the conclusion that external  $K^+$  may be the major factor for the inhibition of hormone release.

We next examined the kinetics of ACTH release under different  $[K^+]$ . The hormone concentration in the supernatant media was reduced significantly in AdH compared with control groups. The ACTH release in PRLoma was also presented under different  $[K^+]$  exposition. The ACTH release of PRLoma was increased significantly depending upon the duration of experiment. In the 1.5 and 2.0 mM  $[K^+]$  manipulated groups the ACTH secretion was decreased depending upon the duration of exposure. The hormone levels in the PRLoma group treated with 1.0, 0.5 and 0 mM  $[K^+]$  were elevated significantly compared to control groups.

We examined the correlation between the normal and the altered endocrine regulation modified by hypokalaemia. Under hypokalaemia the ACTH release of PRLoma was increased significantly, in contrast to control AdH. A similar interaction is depicted in the PRL release because the PRL content of supernatant media increased significantly ( $p < 0.001$ ) in PRLoma compared with control AdH. According to our hypothesis the cell aging machinery may play role in this phenomenon.

The Bcl-2 production was investigated and immunocytochemistry showed that Bcl-2 expression was reduced under hypokalaemic conditions.

We also wanted to investigate the discrete balance alteration by the effects of HD agents. The applied doses of ClB (0.1, 1.0 and 10.0  $\mu\text{g/ b.w. kg}$ ) modified the ACTH release of serum and the monolayer cell cultures depending on the duration of exposure. The subtoxic exposure of ClB enhanced significantly the ACTH levels compared with the control groups. Notable enhancement was observed in the  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase enzyme activity compared with the control. According to immunohistochemistry, the pituitary tissue in control groups revealed a normal histological structure. In contrast, in the ClB treated groups intense immunoreaction was observed for ACTH.

Based on the findings, we grouped our results and conclusions around the topics defined in the objectives of this research. Our conclusions are summarized:

1. Our investigations on the cellular alterations caused by hypokaleamia are given new information.
  - a. The cell and its environment can be characterized by determinative system roles. Changes in the system structure are mediated by the control and the regulation. The regulation exerts to conserve the system in its current stage while the control leads it through the stages of development. The control in the alteration of extracellular ion milieu forces immediate response

mechanisms that can be detected in the level of regulation by the modification of hormone release. Since the extracellular environment is under persistent fluctuation, thus, the cell has to adapt to it (hyperpolarization and apoptosis). To investigate these mechanisms *in vitro* and *in vivo* research protocols were made.

- b. The extracellular ion milieu ensures the sign and maintaining inputs, which realize the accommodation of normal and transformed cell populations.
  - c. According to the literature around the environment of different tumours hypoionic conditions can be detected related to essential monovalent cations. In our research protocol it is postulated that the induced apoptosis by hypokaleamia deputizes the system's defensive function.
  - d. Our preliminary studies may give possibilities to design therapeutic protocols to treat diseases and cancers that that affect endocrine tissues.
2. The ClB are HD agents however, continue to be used as chemical intermediates, solvents, and pesticides in spite of incomplete knowledge of their chronic toxicity, thus *in vivo* and *in vitro* model systems were developed and standardized for the investigation of these agents.
- a. The extreme low, subtoxic dose of ClB, as chemical stressors modified the ACTH release *in vivo* and *in vitro* via the simulation of the most common exposition pathway (food chain).
  - b. Our results showed that the applied doses of ClB have direct and indirect effect on the biological systems.
  - c. The HD agents altered the discrete energy transfer via the modification of  $Mg^{2+}$ -dependent ATPase activity.
  - d. The chronic and subtoxic doses of ClB treatments structural alterations were detected in the histology of AdH, which were caused by the proliferative manner of these persistent organic compounds.